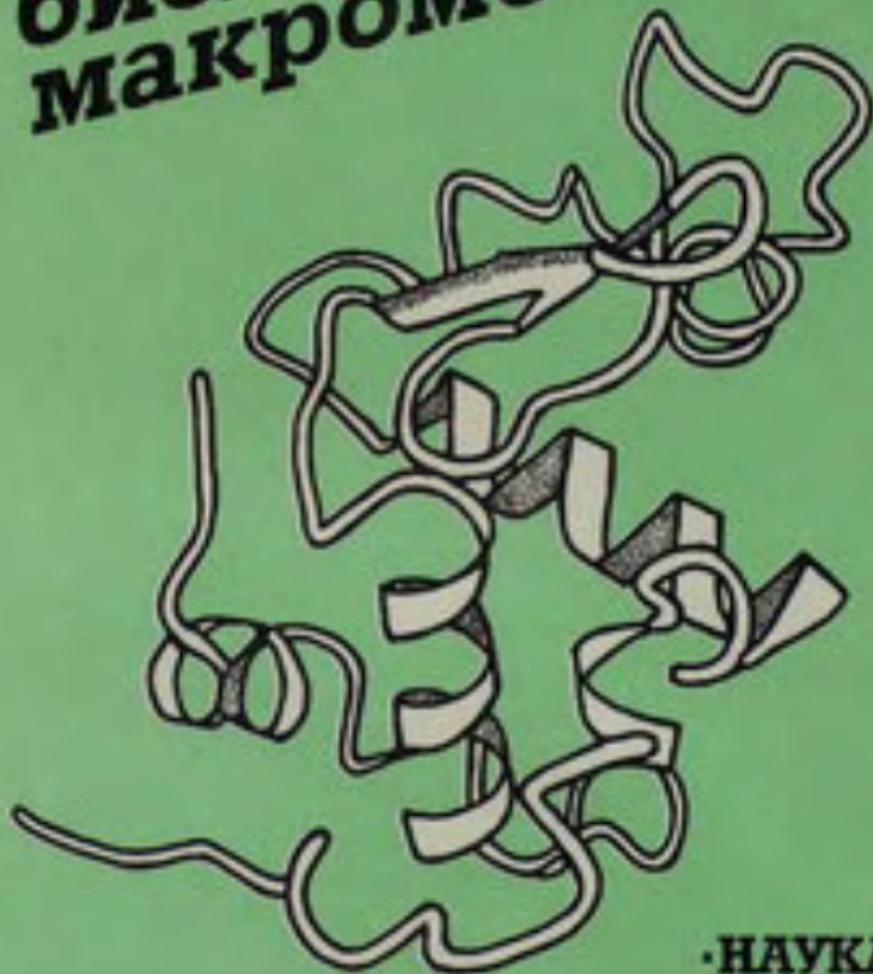




ТРИТИЕВАЯ ПЛАНИГРАФИЯ биологических макромолекул



· НАУКА ·

**ТРИТИЕВАЯ
ПЛАНИГРАФИЯ
*биологических
макромолекул***

ОСНОВЫ И ТЕХНИКА МЕТОДА ТРИТИЕВОЙ ПЛАНИГРАФИИ

Какой бы экспериментальный метод исследования структуры мы ни использовали, крайне важно хорошо представлять себе границы и возможности его применения, связь определяемых параметров с реальными структурными характеристиками изучаемого объекта. Только при этом условии можно надеяться на корректную интерпретацию получаемых данных и на исключение артефактов, практически неизбежно сопутствующих любому эксперименту. Очевидно, что такой грамотный подход требует понимания процессов, в результате которых и получается искомая информация. Это важно при использовании как обычных, "классических" методов и подходов, так и, в особенности, новых, нетрадиционных.

При всей своей кажущейся простоте метод тритиевой планиграфии на деле весьма сложен в части структурной интерпретации экспериментальных данных и требует знания физики и химии процессов, составляющих его основу.

Опыт показал, что простого описания техники и общих принципов метода, подобного тому, которое принято включать в журнальные публикации в раздел "эксперимент", недостаточно для грамотного его использования. Положение осложняется тем, что экспериментатор, работающий в области структурной и физико-химической биологии, а именно этой категории исследователей и адресован метод, очень часто имеет лишь самые общие представления о физике атомных пучков и кинетике элементарных химических актов. Еще труднее требовать от специалиста физика или химика понимания специфических свойств биологических объектов, без знания которых в принципе невозможна корректная постановка эксперимента. Эти обстоятельства побудили авторов включить в данную работу специальную главу, в которой мы в сжатой форме постарались дать описание основных

физических принципов, составляющих фундамент метода тритиевой планиграфии, кинетики основных элементарных химических процессов, обуславливающих образование меченых продуктов, определение которых и дает искомую структурную информацию. С нашей точки зрения, полезным может быть описание практической части эксперимента, включающее стандартные приемы работы с высоковакуумной техникой, низкими температурами, а также методы, используемые при анализе исследуемых объектов. В каждом конкретном случае специфика исследуемого объекта неизбежно вносит свои особенности, но многие приемы имеют общий характер. Авторы надеются, что такого рода материал окажется полезным для понимания результатов, полученных при изучении конкретных биологических объектов и систем, которое составляет основную часть работы, а также позволит сформулировать и поставить новые задачи в областях, в которых метод тритиевой планиграфии еще не нашел своего применения.

1.1. Горячие атомы

Сам термин "горячие атомы" обязан своим происхождением ядерной химии и связан с открытием Сциллардом и Чалмерсом в 30-х годах химических эффектов, сопровождающих ядерные реакции. Образующиеся в результате ядерных реакций атомы "уносят" избыток энергии в форме кинетической энергии (атомы отдачи) и стабилизируются в виде химических соединений, отличных от исходного "материнского" продукта. Энергия отдачи во много раз превышает кинетическую энергию частиц при обычных (10^2 – 10^3 K) температурах¹.

Например, в случае атомов трития, радиоактивного изотопа водорода, получающегося при ядерных реакциях захвата нейтронов ядрами изотопов литий-6 или гелий-3 с испусканием α -частицы или протона



энергия отдачи составляет 2.73 МэВ и 0.192 МэВ, соответственно². Такую энергию должны иметь частицы, нагретые до

¹ Здесь и далее температура выражается в шкале Кельвина. $0^\circ\text{C} = 273.16$ K.

² Электрон-вольт (эВ) – единица энергии. $1 \text{ Эв} = 3.83 \cdot 10^{-20} \text{ кал} = 1.602 \cdot 10^{-12} \text{ эрг} = 23 \text{ ккал/моль}$. $1 \text{ МэВ} = 10^6 \text{ эВ}$.

температуры 10^9 – 10^{10} К. Отсюда и название, принятое для обозначения таких атомов, – "горячие". Исследование необычных физических и химических процессов, протекающих с участием атомов отдачи, составило предмет целой самостоятельной области ядерной химии, получивший название "химии горячих атомов". Отличительной чертой химии горячих атомов от обычной "тепловой" химии является то, что энергетически реакционная система в целом является неравновесной. Функции распределения по энергии для горячих частиц и молекул среды, с которой они взаимодействуют, отличаются по параметрам и форме. Другая важная особенность этой области химии состоит в том, что горячие частицы приближаются к области реакционной способности, т.е. к диапазону энергий, при которых становится в принципе возможным образование химически стабильных продуктов "сверху", со стороны высоких энергий. Как следствие – вероятность горячих реакций не зависит от температуры среды.

Исследования реакций горячих атомов позволили если и не решить, то по крайней мере пролить свет на фундаментальный вопрос химической кинетики: о связи вероятности элементарного химического акта с кинетической энергией взаимодействующих частиц или о виде функции возбуждения химической реакции.

Химия горячих атомов водорода (третия) представляет собой наиболее детально исследованную область химии горячих атомов. Это связано не только с принципиальной значимостью для кинетики реакций атомарного водорода – простейшей химической системы, для которой возможны сложные квантово-механические расчеты и которая в силу этого играет роль уникальной модельной системы, – но и с относительной доступностью экспериментальных методов генерации горячих атомов водорода с различной заданной начальной энергией. Очевидно, что ядерные реакции, дающие частицы с энергиями, на много порядков превышающими энергии химических связей и потому в принципе не способные к образованию стабильных продуктов, не могут непосредственно использоваться для выяснения механизма химических актов. С существенно меньшими энергиями горячие атомы водорода могут быть получены при фотолизе водородсодержащих соединений под действием света в области ультрафиолета и вакуумного ультрафиолета, а также с использованием техники атомных и ионных пучков. Эти методы позволяют проводить исследования с частицами, энергия которых составляет 1–100 эВ,

что уже близко или сравнимо с энергией химической связи. Мы ограничимся здесь рассмотрением только тех реакций горячих атомов водорода, которые приводят к образованию конечного продукта, включающего первичный горячий атом (меченого продукта, если атом водорода – тритий) и системами, в которых второй реакционный партнер – молекула углеводорода. В таких системах в принципе возможны следующие процессы:



Здесь индексом * отмечены горячие частицы, T – атом трития, M – молекула среды, при столкновении с которой химической реакции не происходит, но передается часть кинетической энергии горячей частицы, RH – молекула углеводорода, Olefin – ненасыщенное органическое соединение, RX – производные углеводородов, в которых X = OH, SH, NH и др. В качестве замедлителя M может выступать любая молекула, в том числе и углеводорода.

Реакция (1) описывает процесс, в котором происходит разрыв одной или нескольких ковалентных связей в молекуле углеводорода с образованием осколков, один из которых включает атом трития. Реакция (2) протекает по механизму прямого замещения, при котором горячий атом трития "выбивает" атом водорода из молекулы и сам занимает его место. Реакция (3) – отрыв водорода с образованием свободного радикала. В этом случае образование меченого продукта может происходить в результате последующей реакции рекомбинации радикала с холодным атомом трития (реакция (7)). Реакция (4) описывает процесс отрыва от молекулы-мишени функциональных групп и аналогична реакции (3). Реакция (5) – присоединение атома трития по

кратной связи. Образующийся в результате радикал обладает избыточной энергией и может либо распадаться с отщеплением водорода, например $C_2H_4T^* \rightarrow C_2H_4 + T$ или $C_2H_3T + H$, либо стабилизироваться в результате столкновений или перераспределения энергии по внутренним степеням свободы. Реакция (6) описывает процесс термализации или замедления горячего атома. Этот процесс протекает с большой вероятностью и играет важную роль в формировании набора конечных продуктов. Охладившиеся до температуры окружающей среды атомы трития реагируют как обычные тепловые частицы, захватываясь радикалами и присоединяясь по кратным связям, или рекомбинируют друг с другом: $T + T + M \rightarrow T_2 + M$.

Каждый из приведенных выше процессов доминирует в своем энергетическом диапазоне, и, если найти способ варьировать начальную энергию горячих атомов, можно влиять на спектр образующихся продуктов. Прямые экспериментальные исследования с различными источниками горячих частиц и теоретические расчеты позволили определить энергетические пороги некоторых горячих процессов и вид функции возбуждения. Так, реакция (1) с разрывом С–С-связей в молекулах углеводородов ("крекинг") имеет пороговую энергию, равную 4.5 ± 0.5 эВ [26]. Вероятность (сечение) реакции растет с увеличением энергии и достигает максимального значения при 20 эВ. Прямое замещение водорода (реакция (2)) становится возможным при энергии горячего атома больше 1.5 эВ, и его вероятность проходит через максимум при 12 эВ [26, 27]. Самая низкоэнергетическая реакция – отрыв водорода. Ее сечение отлично от нуля, начиная с энергии 0.3 эВ, и функция возбуждения имеет максимум при 1.5 эВ [19, 25]. Схематически ситуация с тремя каналами реакции образования меченого продукта представлена на рис. 1.1.

Выше, говоря о вероятности химических реакций, мы использовали как синоним термин "сечение". Эта характеристика принята в физике при описании столкновений частиц. В первом приближении сечение может быть интерпретировано как площадь круговой мишени, при попадании в которую частицы-снаряда происходит изменение каких-либо измеряемых параметров системы – физических (например, траектории движения, энергии) или химических. Процесс столкновения двух частиц представлен на рис. 1.2. Геометрическое сечение процесса может быть определено как $\sigma = \pi(r_1 + r_2)^2$, где r_1 и r_2 – радиусы сталкивающихся

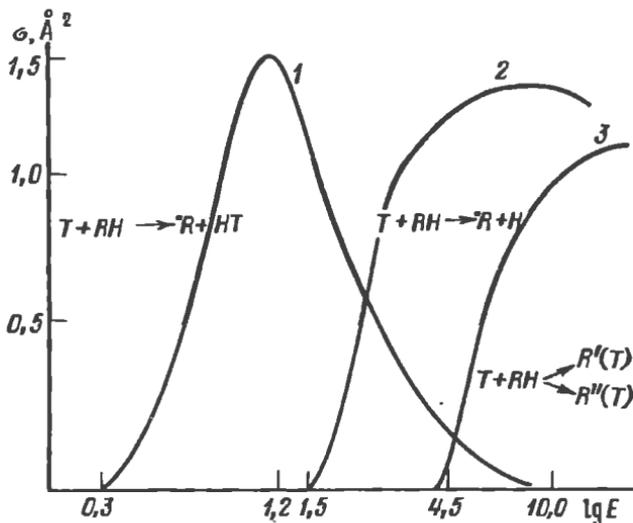


Рис. 1.1. Зависимость сечения (вероятности) реакций атомов трития от энергии взаимодействующих частиц для отрыва водорода (1), прямого замещения водорода на тритий (2) и диссоциативного распада (3), приводящих к образованию меченого продукта

Отмечены пороговые энергии реакции (0,3, 1,5 и 4,5 эВ), начиная с которых скорость процесса отлична от нуля, и энергии, соответствующие максимуму вероятности (1,2, 10 эВ)

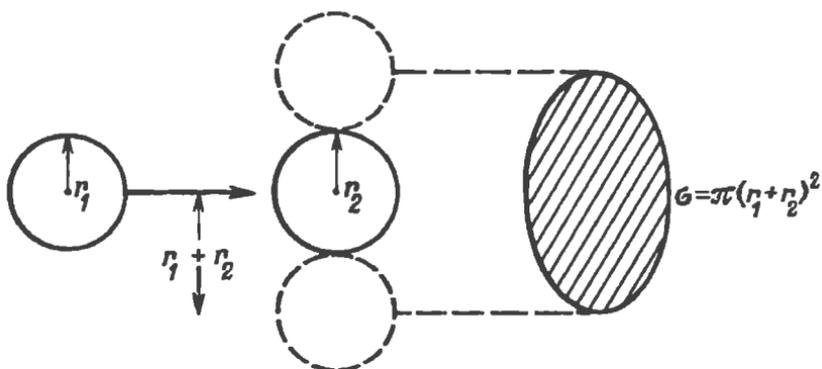


Рис. 1.2. Схемы, иллюстрирующие понятие "сечения" химического взаимодействия

r_1 и r_2 – радиусы сталкивающихся частиц. При пролете частиц на расстоянии, большем $r_1 + r_2$, взаимодействие отсутствует. Сечение реакции может быть представлено в виде площади круговой мишени с радиусом $R = r_1 + r_2$, при "попадании" в которую и происходит взаимодействие

партнеров. Величину $R = r_1 + r_2$, равную максимальному расстоянию между траекториями сталкивающихся частиц, при котором еще возможно их взаимодействие, принято называть прицельным параметром.

Абсолютные значения сечений для большинства процессов с участием атомов трития неизвестны. По некоторым данным, сечение реакции отрыва (3) в максимуме достигает величины порядка 2 \AA^2 [23]. Реакция прямого замещения (2) исследовалась теоретически и экспериментально для системы $T + H_2$ [32]. Максимальное значение сечения этого процесса было определено равным 1.6 \AA^2 . Сечение диссоциативного процесса (1) в области высоких (50 эВ) энергий составляет 1 \AA^2 , дальнейший его ход не определен. С максимальной вероятностью протекают процессы замедления или термализации. Ниже мы остановимся на их механизмах более детально. Здесь же отметим, что в области малых энергий сечение замедления составляет 40 \AA^2 , т.е. доля столкновений горячего атома трития с молекулами углеводорода, приводящих к образованию меченого продукта, в общем случае невелика и скорее всего не превышает 5–10% от общего числа столкновений.

Вернемся к схеме на рис. 1.1 и рассмотрим изменения спектра меченых продуктов по мере уменьшения начальной энергии горячего атома трития. Как следует из схемы, при энергии атомов трития $E \geq 4.5$ эВ в системе возможны все три основные горячие реакции. При этом, если реакция разрыва C–C-связи осуществляется только с участием первичных частиц, то в реакциях замещения и отрыва водорода могут участвовать как первичные частицы, так и частицы, потерявшие часть своей энергии при нерреакционных столкновениях. При энергиях ниже порога 4.5 эВ реакция деструкции (1) становится невозможной и в системе реализуются только реакции (2) и (3). Наконец, при энергиях $0.3 < E < 1.5$ эВ для атомов трития остается открытым только один реакционный канал – отрыв водорода. Происходит это с участием первичных частиц или в процессе участвуют частично термализованные атомы, зависит от величины передаваемой при нерреакционном столкновении энергии. Если оставшаяся после столкновения энергия оказывается меньше порогового значения 0.3 эВ, то образование продукта будет обусловлено только первичными частицами и, следовательно, будет характеризовать стерическую доступность молекулы или ее

фрагмента для атаки первичной горячей частицы (энергетический фактор, как уже отмечалось выше, для реакций горячих атомов не играет роли). Стерическая доступность в свою очередь определяется пространственной структурой молекулы, и именно это составляет суть метода тритиевой планиграфии.

1.2. Нереакционные столкновения. Замедление горячих атомов

Механизм этого важнейшего процесса, к сожалению, исследован далеко не полностью. Хорошо развита теория замедления для атомов с высокой кинетической энергией. Происходящие при замедлении процессы достаточно хорошо описываются в предположении о механизме упругих столкновений, и для их описания могут быть использованы представления, развитые для замедления нейтронов.

При упругом столкновении частиц с массами m_1 и m_2 доля энергии, оставшейся у одной из частиц, определяется уравнением:

$$\frac{E_1}{E_1^0} = \frac{m_1^2 + m_2^2 + 2m_1m_2 \cos \theta}{(m_1 + m_2)^2},$$

где θ – угол рассеяния в системе центра масс, E_1 и E_1^0 – начальная и оставшаяся после столкновения энергия частицы с массой m_1 (см. рис. 1.3).

Потеря энергии или энергия, передаваемая горячим атомом частице среды, составляет соответственно

$$\frac{E_1^0 - E_1}{E_1^0} = \frac{2m_1m_2(1 - \cos \theta)}{(m_1 + m_2)^2}.$$

Для характеристики замедляющей способности среды часто используют логарифмический декремент потери энергии, учитывающий все углы рассеяния θ

$$\bar{\xi} = \ln \frac{E_0}{E}.$$

Здесь E_0 и E – начальная и конечная энергия горячего атома. Среднее число столкновений, необходимое для снижения энергии от E_0 до E :

$$\bar{Z} = \frac{\ln \left(\frac{E_0}{E} \right)}{\bar{\xi}}.$$

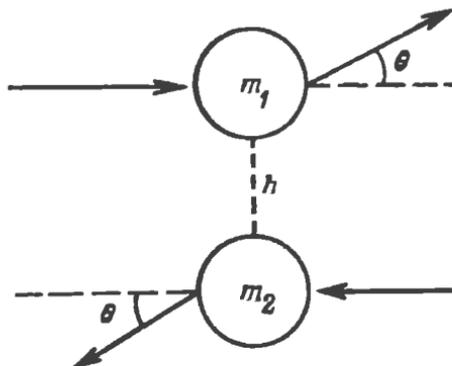


Рис. 1.3. Схематическое представление упругого рассеяния частиц m_1 и m_2 в системе центра масс

θ – угол рассеяния, h – прицельный параметр

Величина $\bar{\xi}$ связана с массами сталкивающихся частиц:

$$\bar{\xi} = 1 + \frac{\alpha \ln \alpha}{(1 - \alpha)},$$

где

$$\alpha = \left(\frac{m_1 - m_2}{m_1 + m_2} \right)^2$$

– минимальная доля энергии, остающаяся у атома после столкновения (при $\theta = 180^\circ$).

При замедлении горячего атома в двухкомпонентной системе:

$$\bar{\xi} = \frac{n_i \sigma_i \bar{\xi}_i + n_j \sigma_j \bar{\xi}_j}{n_i \sigma_i + n_j \sigma_j},$$

где n_i, n_j и σ_i, σ_j – молярные доли и микроскопические сечения рассеяния атома на компонентах i и j соответственно.

Для замедления горячего атома трития ($m_1 = 3$) в среде углеводорода, например метана CH_4 , рассматривая по отдельности замедление на атомах углерода и водорода ($n_{\text{C}} = 1$ и $n_{\text{H}} = 4$), получим:

$$\bar{\xi} = \frac{1\sigma_{\text{C}} \cdot 0.43 + 4\sigma_{\text{H}} \cdot 0.54}{\sigma_{\text{C}} + 4\sigma_{\text{H}}},$$

здесь 0.43 и 0.54 величины $\bar{\xi}$ для замедления при столкновениях

атома трития с атомами углерода и водорода соответственно. Для оценки сечений столкновений $T + C$ и $T + H$ можно использовать газокинетические диаметры соответствующих атомов: $\sigma_{T-H} = 19.6 \text{ \AA}^2$ и $\sigma_{C-H} = 35.2 \text{ \AA}^2$. В этом случае $\bar{\xi} = 0.506$. Для замедления атома трития на молекуле метана как целом ($m = 16$) получим $\xi = 0.33$.

Все эти оценки справедливы для случая, когда потери энергии горячим атомом на возбуждение внутренних степеней свободы молекулы-мишени малы по сравнению с его начальной энергией. Первые электронно-возбужденные уровни для большинства молекул лежат в пределах 5–10 эВ, колебательные и вращательные уровни лежат существенно ниже. Таким образом, механизм упругих потерь энергии может служить хорошим приближением для горячих частиц с начальной энергией 100 эВ и выше.

Механизм релаксации поступательной энергии атомов для энергий $E \sim 10$ эВ практически не исследован. Из экспериментов с плазмой и в ударных волнах известно, что в этой области имеет место возбуждение как электронных, так и колебательных и вращательных уровней молекул, причем сечения этих процессов сильно зависят от энергии столкновения и часто носят резонансный характер.

Особенно сложно теоретическое рассмотрение процесса замедления в случае сложных органических молекул и для твердой фазы, в первую очередь из-за высокой степени коллективности системы.

Можно попытаться оценить основные параметры релаксации, исследуя экспериментальные данные, полученные с использованием фотохимической техники для замедления атомов водорода с начальной энергией ~ 1 эВ на различных молекулярных газах. Для атомов водорода с начальной энергией $E = 1.1$ эВ (фотолиз HI под действием УФ-света с длиной волны 2982 Å) были определены эффективные замедляющие способности ряда углеводородов и их производных, а также инертных газов – аргона и ксенона [24, 29]. Для определения нижней границы энергии, до которой происходит замедление, использовали пороговую реакцию $H^* + COS \rightarrow CO + \cdot SH$ (порог реакции $E = 0.17$ эВ) [28]. В качестве замедлителей использовали аргон, ксенон, углеводороды C_2H_6 , C_3H_8 , C_4H_{10} , некоторые фторалканы и SF_6 . Для оценки числа столкновений, необходимых для снижения энергии от $E_0 = 1.1$ эВ до $E_1 = 0.17$ эВ, рассчитывали отношение сечений, ис-

Таблица 1.1

Относительная замедляющая способность молекулярных газов
(по отношению к аргону) для атомов водорода с $E_0 = 1.1$ эВ

Замедли- тель	C_2H_6	C_3H_8	$n-C_4H_{10}$	CH_3F	C_2F_6	C_3F_8	SF_6	Ar	Xe
σ_m / σ_{Ar}	1.34	1.64	1.75	1.23	1.81	2.20	1.79	1	1.21
$\bar{\xi}_m / \bar{\xi}_{Ar}$	2.8 ± 0.7	3.1 ± 0.6	3.4 ± 0.5	1.8 ± 0.5	1.15 ± 0.17	1.0 ± 0.2	0.74 ± 0.12	1	0.29 ± 0.06

пользуя параметр σ потенциала Леннарда–Джонса (так называемого потенциала 6–12) – $V_r = 4\epsilon[(\sigma/r)^{12} - (\sigma/r)^6]$. Для σ_m / σ_{Ar} были получены значения, представленные в табл. 1.1.

Используя экспериментальные зависимости выхода CO как функции концентрации замедляющих добавок, авторы [29] определили относительные замедляющие способности $\bar{\xi}_m / \bar{\xi}_{Ar}$. Соответствующие значения также приведены в табл. 1.1.

Потеря энергии горячего атома H^* ($E_0 = 1.1$ эВ) при столкновениях с атомами инертных газов может происходить только по механизму упругих столкновений, так как энергия нижних электронно-возбужденных уровней существенно превышает его кинетическую энергию: 11.5 эВ и 8.3 эВ для аргона и ксенона соответственно. В самом деле, расчет дает $\bar{\xi}_{Xe} / \bar{\xi}_{Ar} = 0.31$, что хорошо совпадает с полученным в эксперименте (0.29 ± 0.06). Используя расчетные величины $\bar{\xi}$ для замедления в инертных газах и экспериментальные отношения $\bar{\xi}_m / \bar{\xi}_{Ar}$, приведенные в таблице, можно определить логарифмические декременты потери энергии для других молекулярных газов. При этом оказалось, что для углеводородов C_2H_6 , C_3H_8 и $n-C_4H_{10}$ величины $\bar{\xi}$ практически одинаковы и с хорошей точностью можно считать $\bar{\xi} = 0.17 \pm 0.01$.

Заметим, что расчеты декрементов потери энергии по механизму упругих столкновений для этих углеводородов дают существенно меньшие значения.

Например, для замедления на этане рассчитанные и экспериментальные величины декрементов отличаются в 2.5 раза. Это однозначно свидетельствует о том, что механизм упругих столкновений не применим для описания релаксации кинетической энергии атомов водорода на молекулах с несколькими внутренними степенями свободы. Остается неясным, работает ли эта

закономерность при энергиях атомов водорода ниже 1 эВ и как изменяются параметры релаксации при понижении энергии. Кроме того, описанные эксперименты были проведены для легкого изотопа водорода ^1H , а для тяжелого изотопа – трития ^3H – характеристики термализации могут быть существенно иными. Эксперименты с дейтерированными углеводородами показали, что замена H на D в молекуле-мишени уменьшает величину логарифмического декремента потери энергии в 3.7 раза, т.е. замедление D на углеводороде C_2H_6 в 3.7 раза меньше, чем H на C_2H_6 [16].

Для атомов отдачи трития ($E = 0.192$ МэВ) было показано, что и в этом случае вклад в термализацию неупругих процессов (второй компонент системы – этан C_2H_6) весьма существен: декремент потери энергии, полученный экспериментально почти в 20 раз превышает величину, рассчитанную для механизма упругих столкновений [15]. Величина $\bar{\xi} = 0.17$, определенная для энергии 1.1 эВ, может рассматриваться только как ориентировочная для оценки процессов замедления атомов трития в области энергий, сопоставимых с пороговыми энергиями приведенных выше реакций, и для более точных оценок необходимы прямые эксперименты.

1.3. Включение метки и структурная информация

Выше мы так подробно остановились на вопросах, связанных с сечениями химических реакций и замедления горячих частиц, поскольку именно эти процессы определяют глубину проникновения горячих атомов в вещество-мишень. В общем случае глубина проникновения связана с числом столкновений Z , которые испытывает горячий атом при прохождении слоя X , и длиной свободного пробега λ , т.е. расстоянием, которое проходит частица между двумя последовательными столкновениями

$$X = Z\lambda.$$

Длина свободного пробега определяется энергией горячей частицы, плотностью среды и сечением столкновения:

$$\lambda = 1/n\sigma,$$

где n – плотность вещества-мишени, v – скорость горячих атомов трития,

$$v = \sqrt{\frac{2E}{m}}.$$

Величина σ представляет собой суммарную величину, включающую сечение химической реакции и сечение рассеяния, приводящие к снижению энергии. Вклад последнего наиболее существенен ($\sigma_{\text{реакции}} \sim 1\text{--}2 \text{ \AA}^2$, $\sigma_{\text{рассеяния}} \sim 40 \text{ \AA}^2$). $\sigma_{\text{реакции}}/\sigma_{\text{рассеяния}} = 1/40$, т.е. толщина слоя, в котором осуществляется горячая реакция и образуется меченый продукт, зависит от эффективности замедления быстрой частицы.

Метод тритиевой планиграфии призван дать информацию о поверхности исследуемого объекта (отсюда и название метода: от латинского *planum* – поверхность и греческого *grapho* – пишу), возможность его применения определяется толщиной реакционного слоя. Очевидно, что эта величина зависит от энергетического порога реакции, приводящей к включению тритиевой метки, начальной энергии падающих на мишень атомов трития и замедляющей способности среды $\bar{\xi}$. Идеальной является ситуация, при которой вся включенная метка обусловлена первым и единственным столкновением горячего атома с мишенью.

Как уже отмечалось, для горячих атомов трития возможны три направления реакции, приводящие к образованию меченого продукта: разрыв С–С-связи с образованием меченых "осколочных" фрагментов, прямое замещение водорода и отрыв водорода. В последнем случае образуется свободный радикал (немеченный), который может дать меченый продукт в результате последующей рекомбинации с холодным атомом трития. Как прямое замещение, так и двухстадийный процесс отрыва-рекомбинации приводят в результате к меченому продукту, химически тождественному исходному "материнскому" соединению. В зависимости от энергии горячего атома трития в системе могут реализоваться все три типа реакций, или преобладать один из них. Представим себе, что у нас имеется источник горячих атомов трития с энергией E , большей или равной порогу наиболее высокоэнергетического процесса (разрыв С–С-связи, $E_p = 4.5 \text{ эВ}$). При этом, очевидно, протекают все указанные процессы, но основной вклад в образование меченого материнского продукта вносит реакция прямого замещения, сечение которой в этой области близко к своему максимальному значению ($E_{\text{max}} = 10 \text{ эВ}$). Процессы замедления, сечение которых во всем энергетическом интервале более чем на порядок превышает сечение химических реакций ($\sigma_s = 10\text{--}20 \text{ \AA}^2$), дают вторичные горячие атомы, энергия которых составляет $E = 0.84$, $E_0 = 3.8 \text{ эВ}$ (принимая $\bar{\xi} = 0.17$, полу-

ченное для замедления Н на углеводородах), что дополнительно увеличивает выход продукта реакции прямого замещения. Вклад реакции отрыва водорода при этом сравнительно невелик: сечение этой реакции мало, а для снижения энергии атомов трития от 4.5 до 1.2 эВ (максимум сечения отрыва) необходимо 8 столкновений.

Для источника атомов трития с энергией $1.5 \leq E < 4.5$ эВ вероятность разрыва С–С-связей близка к нулю, и в системе реализуются лишь два реакционных канала – прямое замещение и отрыв водорода. Основной вклад при этом дает реакция отрыва, сечение которой близко к максимальному значению. Нерекционные столкновения увеличивают поток атомов с энергией, отвечающей максимуму сечения отрыва (потеря энергии при однократном столкновении атома с $E = 2$ эВ дает частицы с энергией $E = 2 \cdot 0.84 = 1.68$ эВ).

Наконец, в случае источника атомов трития с энергией $0.3 \leq E < 1.5$ эВ единственно возможный химический процесс – отрыв водорода. Для атомов трития с начальной энергией, меньшей пороговой для отрыва ($E < 0.3$ эВ), очевидно, горячие реакции в принципе невозможны и протекающие в системе процессы подчиняются законам обычной тепловой химии.

Для снижения энергии атомов трития от $E_0 = 1.5$ эВ до предела реакционной способности (0.3 эВ) необходимо около 10 столкновений.

Толщина реакционного слоя при этом будет составлять $X = 10 \lambda$ и при $\lambda \approx 3 \text{ \AA}$ (для кристаллической структуры твердого тела) $X \approx 30 \text{ \AA}$. Сама по себе эта величина является типичной для большинства физических методов исследования поверхности (глубина анализа для разных методов лежит в пределах 3–100 Å), но она слишком велика, если говорить об исследовании молекулярной структуры. Чтобы метка включалась только при первом столкновении горячего атома с мишенью, толщина реакционного слоя должна быть близка к длине свободного пробега. Это условие может быть выполнено в том случае, когда начальная энергия атома трития меньше порога реакции прямого замещения, т.е. включение метки обусловлено только реакцией отрыва, а потеря энергии горячей частицы в результате уже одного нерекционного столкновения такова, что "переводить" ее в энергетическую область, в которой химическое взаимодействие (по горячему механизму) невозможно.

Иными словами, начальная энергия атома трития, определяемая неравенством $0.3 \leq E_0 < 0,84 E_0$ эВ, должна быть равной $E_0 \sim 0,4$ эВ.

Реакция отрыва водорода приводит к образованию свободного радикала, и для включения метки по месту атаки первичного атома необходимо исключить возможность всех вторичных превращений радикала, а именно, внутрирадикальной миграции не спаренного электрона и квадратичных процессов гибели – рекомбинации и диспропорционирования радикалов.

При понижении температуры мишени вероятность этих процессов уменьшается и уже при температуре жидкого азота (77 К) первичный радикал может сохраняться в течение нескольких часов. При этом подвижность атомарного водорода в твердой матрице остается весьма высокой. Методом ЭПР показано, что атомы водорода могут проникать в конденсированную матрицу на глубину до 10^{-4} см [24], и основной путь гибели радикалов – рекомбинация с атомами трития с образованием меченого продукта. Заметим, что концентрация тепловых атомов в системе всегда выше, чем горячих из-за высокой вероятности процесса термализации.

Итак, если ограничена верхняя граница начальной энергии горячих атомов трития ($E_0 \sim 0.4$ эВ) и обеспечены условия, при которых первично образованный радикал гибнет только путем рекомбинации с атомом трития (температура образца-мишени ~ 77 К), то локализация метки полностью определяется стерической доступностью соответствующей связи для атаки первичного горячего атома.

Следовательно, анализируя распределение метки после бомбардировки мишени пучком атомарного трития, можно получить информацию о молекулярной структуре на атомарном уровне, т.е. с разрешением $\sim 1-2$ Å.

Реальная ситуация далеко не так однозначна. Даже в случае строго моноэнергетического источника горячих атомов (что само по себе практически недостижимо) надо иметь в виду, что все протекающие в системе процессы носят вероятностный характер и, строго говоря, не может существовать резкой грани между доступными и недоступными фрагментами (молекулами, связями). Иллюстрацией этого может служить экспоненциальный закон ослабления пучка частиц при прохождении слоя вещества, в результате которого даже на большом удалении от поверхности

имеется отличная от нуля вероятность обнаружить меченый продукт, образованный с участием горячего атома трития. Дополнительный вклад, размывающий границы доступного и недоступного, вносят так называемые туннельные процессы, вклад которых при низких температурах оказывается достаточно существенным. На практике к нулевой доступности следует относить такой уровень включения метки, который равен или близок к фону регистрирующего устройства. В случае трития – это фон сцинтилляционного счета, зависящего от качества сцинтиллятора, уровня шумов электронных регистрирующих схем, и фон естественного космического излучения. Все это необходимо помнить при интерпретации получаемых в эксперименте данных о включении метки, в каждом случае определяя, что именно следует отнести к доступным, а что к "спрятанным" участкам исследуемой структуры. Для уменьшения "волюнтаризма" в проведении этой границы следует по возможности использовать тестовые эксперименты, используя в качестве репера объект или фрагмент объекта с известной доступностью (при этом может использоваться и компьютерное моделирование эксперимента). Примеры таких подходов будут приведены в последующих разделах, посвященных исследованию конкретных систем.

1.4. Техника метода

В этом разделе мы рассмотрим, как реализуются описанные выше принципы в конкретных условиях эксперимента и какие именно приемы и методы следует применять для получения информации о структуре исследуемого объекта. Условно можно весь эксперимент разделить на две части: введение метки и анализ меченых продуктов. Если методы анализа во многом индивидуальны, то процедура "бомбардировки" практически универсальна, и ее приемы мало изменяются в зависимости от индивидуальных свойств конкретного объекта.

1.4.1. Источники горячих атомов трития

Основные требования метода тритиевой планиграфии (наличие горячих атомов трития с энергией ~ 0.4 эВ и низкой температуры исследуемого образца (77 К)) диктуют необходимость использования техники пучков, в которой зоны генерации горячих частиц – источник и исследуемый объект (мишень) – пространственно разделены.

В настоящее время существует достаточно большой набор источников для получения пучков атомарного водорода, однако большинство из них по тем или иным причинам не подходят для тритиевой бомбардировки. Источники, в которых атомы генерируются в микроволновом разделе в ВЧ- или СВЧ-диапазоне, дают при высоком выходе атомарной компоненты метастабильные молекулярные и атомарные состояния и ионы, удаление которых требует специальных приемов. Получаемый в результате пучок атомов имеет тепловую энергию и практически не содержит частиц с требуемой кинетической энергией. Источники с перезарядкой ускоренных ионов хороши тем, что позволяют получить атомы с узким энергетическим распределением, однако из-за технических сложностей они не годятся для получения атомов с энергией меньше ~ 1 эВ. Фотохимическая техника также не позволяет получать низкоэнергетические частицы. Возможно использование замедлителей, например инертных газов, но это приводит к широкому энергетическому спектру частиц, который к тому же трудно рассчитать. Следует отметить, что при использовании фотохимической техники невозможно избежать воздействия на исследуемый объект ультрафиолетового излучения, что влечет за собой фотодеструкцию вещества.

Наиболее перспективными представляются источники с термической диссоциацией. В самом распространенном варианте такие источники представляют собой замкнутую камеру с узким отверстием для вывода пучка. Камера заполняется молекулярным газом и нагревается до температуры, необходимой для его диссоциации на атомы. Выход атомов водорода при этом может быть рассчитан по формуле:

$$\ln K = \ln \left(\frac{P_{\text{H}}^2}{P_{\text{H}_2}} \right),$$

где K – константа равновесия, а P – давление атомарного и молекулярного водорода в камере источника. Интенсивность пучка атомов на расстоянии r от щели источника равна

$$I = \frac{1}{4} \cdot \frac{n\bar{v}s \cos \theta}{\pi r^2},$$

где θ – угол между r и нормалью к отверстию; s – площадь отверстия; $s = hl$, где h – ширина, а l – длина щели; n – концентрация атомов в источнике, \bar{v} – средняя скорость атомов, равная

$(8 RT/\pi M)^{1/2}$. Здесь T – температура, R – газовая постоянная и M – атомная масса. Эта формула справедлива в случае, когда длина свободного пробега внутри источника на много больше ширины щели (h). В противном случае перед щелью образуется облако рассеявшихся молекул, что мешает образованию пучка. Требование $\lambda \gg h$ ограничивает давление молекулярного газа в источнике и соответственно интенсивность атомарного пучка.

Удачная конструкция источника атомарного водорода была предложена Файтом и соавт. [18]. Он представляет собой цилиндр из вольфрама длиной 75 мм и диаметром 5 мм, нагреваемый электрическим током до 1500–3000 К. Для вывода пучка атомов в стенке цилиндра имелось небольшое отверстие. Степень диссоциации водорода, определенная масс-спектрометрически, в этом источнике достигала 90%. Если считать, что диссоциация молекулярного водорода в объеме источника протекает в термодинамически равновесных условиях (что не всегда справедливо, так как большую роль в диссоциации играют процессы, протекающие на стенках камеры), то в получающемся на выходе атомарном пучке должно иметь место максвелловское распределение по скоростям и можно оценить в нем долю частиц, кинетическая энергия которых превышает порог реакции отрыва водорода $E_p = 0.3$ эВ:

$$n_{E>E_p} = \frac{2n}{\sqrt{\pi}(kT)^3} \int_{E_0}^{\infty} e^{-E/kT} \sqrt{E} dE,$$

где k – константа Больцмана, T – температура в градусах Кельвина. Множитель \sqrt{E} можно считать медленно изменяющимся и вынести за знак интеграла, взяв его значение в точке $E = E_p$. Тогда

$$\frac{n_{E>E_p}}{n} \cong \frac{2\sqrt{E_p}}{\sqrt{\pi}(kT)^3} \int_{E_p}^{\infty} e^{-E/kT} dE \cong \frac{2\sqrt{E_p}}{\sqrt{\pi}kT} e^{-E_p/kT}.$$

На рис. 1.4 приведено распределение атомов трития при температуре 2000 К.

Видно, что для атомов с энергией $E > 0.3$ эВ $n_{E>0.3}/n = 0.26$, т.е. 26% всех атомов в пучке имеет энергию, достаточную для отрыва водорода. В то же время доля атомов, способных к реакции прямого замещения ($E_p = 1.5$ эВ), мала и не превышает 0.05%.

Недостатком источника печного типа является сравнительно невысокая интенсивность атомарного пучка, ограниченного шири-

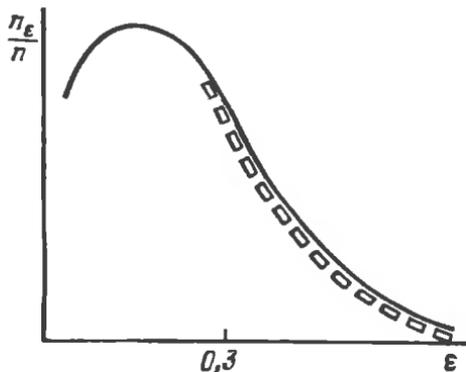
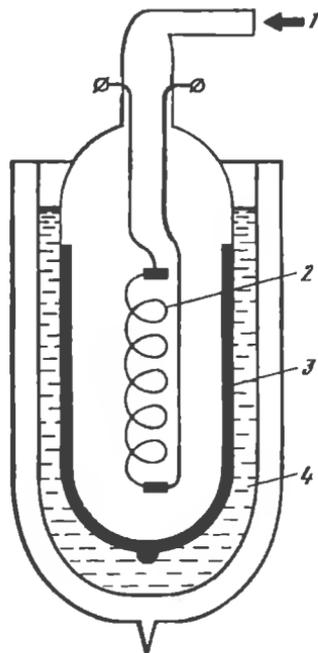


Рис. 1.4. Максвелловский спектр атомов трития, соответствующий температуре 2000 К

Выделена часть спектра частиц с энергией $\epsilon \geq 0,3$ эВ, превышающей пороговую для реакции отрыва (26% от общего потока атомов)

Рис. 1.5. Реактор для атомизации трития

1 – трубопровод для подачи молекулярного трития; 2 – вольфрамовая спираль, нагреваемая электрическим током; 3 – вещество-мишень; 4 – жидкий азот или другой хладагент



ной щели и необходимостью поддерживать в камере источника низкое давление. При типичных размерах щели $hl \sim 2 \cdot 0,01$ мм и давлении в источнике $P \sim 1$ мм рт.ст. ($\lambda = 0,01$ мм) интенсивность пучка на расстоянии 10 см от щели источника составляет $1,8 \cdot 10^{14}$ атомов/см² · с. Другой важный фактор – высокая температура стенок камеры. В приведенном выше примере цилиндрического источника поверхность боковых стенок составляет ~ 25 см² и нагрев такой поверхности до 2000 К будет сопровождаться мощным тепловым потоком на мишень, которую в этом случае необходимо защищать, устанавливая между источником и мишенью дополнительные диафрагмы, что в свою очередь уменьшает интенсивность атомарного пучка.

Как своеобразную модификацию печного источника можно рассматривать устройство, использованное еще на заре века Лэнгмюром и впоследствии часто применявшееся для исследования взаимодействия атомов с твердыми углеводородами [14]. По своему конструкционному решению устройство чрезвычайно просто и по сути моделирует всем хорошо известную электрическую лампу накаливания (см. рис. 1.5). При этом источник

атомов и исследуемые мишени совмещаются в одном объеме – реакторе. Обычно это стеклянный сосуд цилиндрической или сферической формы, в центре которого располагается вольфрамовая нить, нагреваемая электрическим током. Для удобства приготовления образца-мишени реактор обычно делается цилиндрической формы и подсоединяется к вакуумной установке через шлиф. Нить в этом случае натягивается между подводщими электродами по оси сосуда. В объем последнего подается дозированное количество молекулярного водорода – трития, давление которого выбирается так, чтобы были обеспечены условия свободного пробега атомов от нити до боковых стенок реактора, на которые наносится исследуемое вещество-мишень. Заметим, что устройство может работать при постоянном протоке молекулярного трития, но при этом, естественно, увеличивается его расход. При установлении в объеме требуемого давления включается нагрев нити (обычно 2000–2500 К). Попадающие на поверхность нити молекулы T_2 диссоциируют на атомы, которые испаряются в объем с температурой, равной температуре нити, и бомбардируют мишень, находящуюся на боковой стенке. Так как расстояние от нити до мишени соответствует величине свободного пробега, то температуру бомбардирующих атомов можно считать равной температуре нити. В этом устройстве легко достигается термостатирование мишени при низкой температуре жидким азотом (реактор просто погружается в сосуд с хладагентом). Отсутствие каких-либо щелей позволяет достигать весьма значительных потоков атомов на мишень.

Так, при диаметре реактора 60 мм давление трития должно быть порядка 10^{-3} мм рт.ст. ($\lambda \sim 3$ см) и скорость атомизации при 2000 К составляет на 1 см^2 поверхности нити $\sim 10^{19}$ атомов/с. В качестве нитей обычно используется вольфрамовая проволока сечением 0.01 мм и длиной ~ 10 см. Получаемый при этом интегральный поток атомов на мишень будет равен 10^{17} атомов/с. В результате даже короткие экспозиции (~ 10 с) позволяют получить меченый продукт с радиоактивностью порядка 10^9 распад/с.

$$10^{18} \cdot 0.26 \cdot \tau = 10^{18} \cdot 0.26 \cdot 1.7 \cdot 10^{-9} \cong 0.4 \cdot 10^9 \text{ распад/с,}$$

где τ – постоянная β -распада для трития. Эта величина (~ 0.1 Ки) вполне достаточна для проведения анализа. Тепловой поток и световое излучение нити из-за ее малых размеров существенно меньше, чем в случае типичных "печных" источников, однако, и

на этом остановимся ниже, необходимо предпринимать определенные меры для предотвращения термической деструкции мишени.

Именно этот тип источника атомарного трития и использовался во всех известных в настоящее время работах по тритиевой планиграфии.

Используя приведенные выше параметры для реакции отрыва водорода и замедления горячих атомов, можно попытаться рассчитать величину их пробега в конденсированной органической мишени, на котором энергия атома снижается от начальной величины E_0 до порогового значения $E_p = 0.3$ эВ, ниже которого отрыв водорода и, как следствие, образование меченого продукта становятся невозможными. При этом в качестве начальной энергии мы будем рассматривать энергетический спектр частиц, образующихся при диссоциации молекулярного трития на поверхности вольфрама при температуре 2000 К (см. рис. 1.4). Очевидно, что в этом спектре к категории горячих должны быть отнесены все частицы с энергией более $E_0 = 0.3$ эВ. Если разделить весь спектр на узкие энергетические интервалы, например шириной $\Delta E = 0.1$ эВ, в пределах которых частицы можно рассматривать как моноэнергетические, то для каждой такой группы может быть рассчитан спектр замедления. При этом примем для сечения столкновения $\sigma = 40 \text{ \AA}^2$, а для замедляющей способности логарифмический декремент потери энергии $\xi = 0.17$. Плотность органической мишени будем считать равной плотности органических кристаллов ($\rho \sim 10^{23}$ атом/см³). Именно такая величина принимается для характеристики плотности белковой глобулы. Считая затем, что вероятности 0, 1, 2, ..., Z столкновений атома трития с атомами мишени описываются распределением Пуассона

$$\omega(Z) = (\bar{Z})^Z \cdot \frac{e^{-\bar{Z}}}{Z!},$$

получаем зависимость доли реакционноспособных частиц ($E \geq 0.3$ эВ) от глубины проникновения в мишень, или толщину реакционного слоя. Как видно на рисунке 1.6, прохождение слоя толщиной $\sim 6 \text{ \AA}$ снижает долю реакционноспособных атомов с 26 до 0.4%. Отсюда для атомов трития с температурой 2000 К получаем длину пробега $\lambda \approx 0.7 \text{ \AA}$ в твердом органическом веществе с указанной выше плотностью. В физике нейтронов для харак-

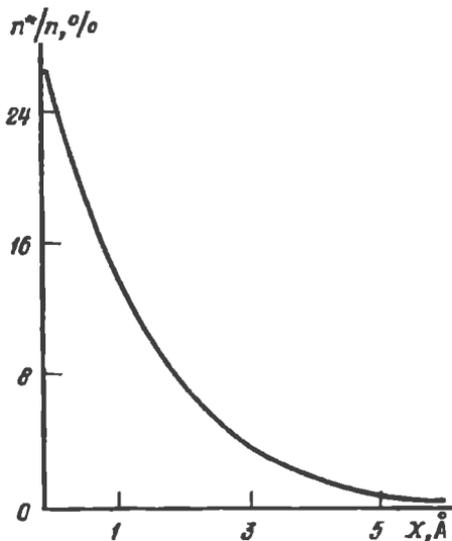


Рис. 1.6. Уменьшение доли атомов трития с энергией $\epsilon \geq 0.3$ эВ при прохождении пучком слоя конденсированного органического вещества толщиной x (в Å)

В расчете принималось допущение, что потери энергии описываются экспоненциальным законом $\exp(-Z\xi)$. Для величины ξ использовались значения, полученные в фотохимическом эксперименте (см. текст). В реальном эксперименте зависимость еще резче, так как имеет место убыль частиц в пучке за счет химической реакции

характеристики ослабления пучка часто используют термин "длина релаксации",

понимая под этим расстояние, на котором поток частиц от плоского источника уменьшается в e раз ($e = 2.718$). Для ослабления потока горячих атомов трития эта величина составляет 1.4 Å .

Приведенные оценки следует рассматривать как ориентировочные в силу достаточно произвольного выбора используемых в расчете параметров (сечений реакции и столкновений, потери энергии и др.), однако, как будет показано ниже, они достаточно хорошо подтверждаются результатами экспериментов.

1.4.2. Установка для введения метки

Основным требованием к экспериментальной установке для введения метки является необходимость обеспечения высокого вакуума (10^{-5} – 10^{-6} мм рт.ст.), быстрого вакуумирования объема реактора, очистки и дозированной подачи молекулярного трития. Схема такой установки представлена на рис. 1.7. Ее центральный узел – реактор (1) был описан выше. Для его изготовления обычно используется стекло марки "пирекс" 7740 или так называемое молибденовое стекло марки 7056 (коэффициент расширения близок к молибдену, что позволяет впаивать токопроводящие электроды непосредственно в стекло).

Подача молекулярного трития в объем реактора проводится из стеклянной ампулы, подпаянной к установке, которая вскрывается в вакууме металлическим стержнем-бойком, перемещаемым с помощью внешнего магнита. Давление трития регулируется

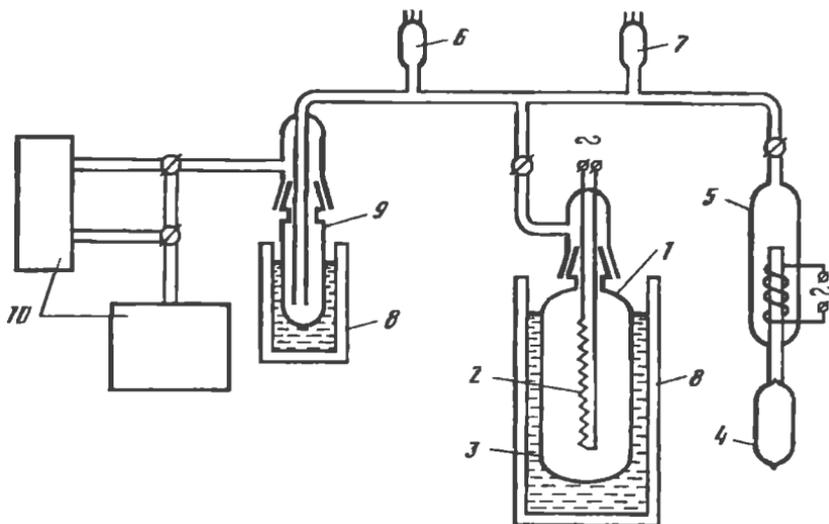


Рис. 1.7. Блок-схема экспериментальной установки для введения метки в биологические мишени

1 – реактор; 2 – вольфрамовая нить; 3 – мишель; 4 – ампула с тритием; 5 – палладиевый натекатель; 6, 7 – термопарный и ионизационный датчики; 8 – сосуд Дьюара с жидким азотом; 9 – ловушка; 10 – насосы

ется либо специальным ventилем тонкой регулировки, подобным используемым в источниках масс-спектрометров, либо через палладиевый натекатель. Последний представляет собой запаянную с одного конца трубку из листовой палладиевой фольги, которая нагревается специальной спиралью. Холодный палладий практически не пропускает никаких газов, хотя с повышением температуры становится проницаемым для молекулярного водорода, но задерживает азот и кислород. Этим достигается и одновременная очистка трития от возможных примесей.

При температуре $\sim 600^\circ\text{C}$ и давлении водорода 25–760 мм рт. ст. проницаемость палладия составляет $9.7 \cdot 10^{-4}$ мм рт.ст. · л/мин · см².

Для измерения остаточного давления в установке и давления трития используются ионизационный и термопарный манометры. Заметим, что рабочее давление трития нельзя измерять ионизационным манометром, так как на входящей в его конструкцию нити – катоде накаливания – также происходит атомизация. Выпускаемые промышленностью термопарные манометры обычно откалиброваны на воздух и для измерения давления водорода их показания должны быть скорректированы. Соответствующие

калибровочные коэффициенты обычно приводятся в технической документации или справочной литературе, но более точно могут быть определены с использованием эталонных манометров, например известного манометра Мак-Леода. По отношению к сухому воздуху коэффициент чувствительности термопарного манометра к водороду обычно принимают равным 0.65, т.е. $P_{H_2} = 0.65 P_{\text{воздух}}$.

Требование высоких скоростей вакуумирования и низкого давления остаточных газов диктует необходимость двухступенчатой откачки: последовательного соединения механического форвакуумного насоса для предварительного разрежения (обычно до 10^{-2} – 10^{-3} мм рт.ст.) и высоковакуумного насоса, позволяющего получать вакуум до 10^{-7} мм рт.ст. Для предотвращения попадания в рабочий объем установки паров масла на пути вакуумирования ставятся специальные ловушки, охлаждаемые жидким азотом. Высокий вакуум можно получить при использовании диффузионных насосов (масляных или ртутных). Эти насосы начинают работать с давления $\sim 10^{-2}$ мм рт.ст. (что обуславливает необходимость их включения после форвакуумного насоса) и обеспечивают высокую скорость откачки (≥ 100 л/с) и остаточное давление $\sim 10^{-7}$ мм рт.ст. Надо отметить, что скорость вакуумирования определяется не только и не столько производительностью насосов, сколько пропускной способностью трубопроводов, соединяющих насос и вакуумируемый объем, в данном случае реактор.

Для молекулярного режима течения газа пропускная способность U трубопровода крупного сечения для воздуха при 20°C определяется зависимостью

$$U = 12.1 \cdot \frac{d^3}{l} \text{ (л/с)},$$

где d и l – диаметр и длина трубопровода в см. Очевидно, что для соединительных участков следует использовать максимально широкие трубопроводы минимальной длины, свести к минимуму наличие запорных кранов с узкими отверстиями.

В заключение следует обратить внимание на влияние остаточного давления газов, растворенных в материале, из которого изготовлена установка, или адсорбированных на ее поверхности. Высокое разрежение и отсутствие "натекания" при отключении насосов достигается при предварительном прогреве всей

установки в процессе вакуумирования, для чего вся установка может быть расположена в нагреваемом чехле.

Работа на установке включает следующие операции.

1. Приготовление в сосуде-реакторе мишени и присоединение реактора к вакуумной установке.

2. Вакуумирование реактора до остаточного давления 10^{-2} мм рт.ст. форвакуумным насосом. Реактор при этом погружен в дьюар с жидким азотом.

3. Включение высоковакуумной откачки и вакуумирование до остаточного давления 10^{-6} – 10^{-7} мм рт.ст.

4. Прогрев стенок установки при включенном насосе.

5. Отключение насоса, проверка отсутствия натекания в систему в течение ~ 10 мин.

6. Подача в объем реактора молекулярного трития через палладиевый натекатель или регулировочный вентиль. Установление рабочего давления по темпопарному манометру.

7. Включение нагрева нити. При этом на первом этапе наблюдается уменьшение давления в реакторе за счет атомизации и расхода атомов на взаимодействие с мишенью. Давление через некоторое время восстанавливается до исходного за счет образования водорода состава НТ в результате реакции отрыва. Экспозиция 10–15 с обычно соответствует практически полной замене молекул T_2 на НТ в газовой фазе и для продолжения эксперимента следует выключить нагрев нити, вакуумировать остаточный тритий и ввести новую порцию газа. Такой режим бомбардировки следует рекомендовать еще и в связи с тем, что период смены рабочего газа позволяет уменьшить опасность термического нагрева вещества-мишени.

8. После последней экспозиции мишени реактор вакуумируется, отключается насос и в реактор напускается атмосферный воздух. Реактор с мишенью отсоединяется от установки, и образец поступает на анализ.

Для предотвращения попадания в атмосферу рабочего помещения избыточного трития при вакуумировании реактора на выходе форвакуумного насоса следует присоединить устройство для его улавливания. Наиболее простой и эффективный способ утилизации трития состоит в его окислении до воды при пропуске над окисью меди при $\sim 400^\circ\text{C}$ с последующим поглощением меченой воды ловушкой. Как показывает практика, при такой защите отходящие газы не содержат заметных следов радиоактивности.

1.4.3. Приготовление мишени

Исследуемый объект – бомбардируемая атомарным тритием мишень – располагается внутри реакционного сосуда и за исключением специальных случаев наносится на его внутреннюю стенку, охлаждаемую жидким азотом. При этом в качестве мишени могут быть использованы пленки сухого вещества, порошки и замороженные растворы или суспензии. Иными словами, практически отсутствуют какие-либо ограничения на фазовое состояние исследуемого объекта, что выгодно отличает метод от рентгеноструктурного анализа, требующего кристаллических образцов, или ЯМР, который наиболее информативен при исследовании жидких систем. Естественно, что термостатирование мишени при температуре жидкого азота обуславливает то, что исследуемый образец находится в твердотельном состоянии в момент бомбардировки. Заметим, что потребность в низкой температуре мишени определяется рядом причин, в частности требованием вакуумной техники и необходимостью исключить возможность попадания исследуемого вещества на поверхность нагретой вольфрамовой нити, приводящего к пиролизу. В принципе, если упругость пара над поверхностью объекта мала, как, например, в случае полимерных образцов, температура мишени может быть достаточно высокой, вплоть до комнатной (300 К). От выбора вида мишени и способа ее приготовления во многом зависит качество получаемой в эксперименте информации и правомерность ее интерпретации в структурных терминах. Определяющими являются следующие факторы. Во-первых, это толщина образца, которая имеет принципиальное значение. Так как пробег реакционноспособных атомов трития составляет величину порядка нескольких ангстрем, то образование меченого продукта ограничивается в буквальном смысле слова поверхностью образца. Вся масса вещества, лежащая ниже реакционного слоя, остается немеченой и снижает тем самым уровень удельной радиоактивности, как бы "разбавляя" меченый препарат. Для увеличения удельной радиоактивности образца приходится прибегать к обновлению поверхности мишени. Это легко достигается путем размораживания и повторного замораживания мишени или ее перерастворения, если облучается сухой препарат. Надо, однако, иметь в виду, что сама процедура замораживания для многих объектов, особенно для лабильных биологических многокомпонентных макромолекулярных комплексов, может со-

проводятся разрушением структуры, и повторение этой операции нежелательно. Вторая причина, обуславливающая необходимость использования тонких и, что существенно, однородных по толщине пленок, – исключение нагрева образца за счет теплового излучения нити и теплопередачи через молекулярный газ. Толщина пленки вещества должна обеспечивать быстрый отвод тепла с поверхности. Экспериментально установлено, что при толщине слоя органического вещества или его водного раствора 0.01 см и стандартных параметрах эксперимента (температура нити 2000 К, расстояние от нити до мишени 3 см) температура образца повышается не более чем на 10–20 К (т.е. до ~90–100 К). Для лучшего охлаждения мишени целесообразно использовать режим бомбардировки, при котором экспозиции (по 10–20 с) мишени в потоке атомов трития чередуются с тридцатисекундными интервалами отключения нагрева нити. Очевидна и необходимость однородности мишени – наличие на ней локальных утолщений может привести к повышению температуры в этих точках. По всей видимости, наиболее приемлемым способом приготовления образцов, удовлетворяющих указанным требованиям, является нанесение вещества на стенки в виде раствора. Цилиндрическая форма реакционного сосуда позволяет, вращая его, добиться равномерного растекания (размазывания) раствора по всей боковой поверхности. Получившаяся пленка жидкости замораживается при помещении вращающегося сосуда в жидкий азот, после чего реактор подсоединяется к установке и вакуумируется при охлаждении жидким азотом реакционного сосуда.

Пленка сухого вещества может быть получена лиофилизацией. В этом случае замороженный образец вакуумируется при комнатной температуре. Растворитель удаляется возгонкой льда. При этом необходимо следить за тем, чтобы раствор не разморозился, а пленка сухого вещества плотно контактировала с поверхностью стенки.

Толщина мишени не должна быть большой еще и по другой причине. При приготовлении образцов путем замораживания раствора необходимо учитывать то обстоятельство, что в течение достаточно длительного времени существует граница раздела фаз жидкость–воздух, на которой могут протекать хорошо известные процессы адсорбции молекул растворенного вещества. Поскольку, как уже отмечалось, воздействию атомарного трития подвергается именно поверхность мишени, то получаемые дан-

ные будут относиться к той части молекул, которые образуют адсорбционный слой. Концентрация молекул на поверхности существенно отличается от их концентрации в объеме и определяется как свойствами вещества и растворителя, так и временем существования границы жидкости. Более существенно, однако, то, что в результате адсорбции молекул в поверхностном слое они могут быть определенным образом ориентированы. Последнее обстоятельство приводит к заведомо ошибочной информации о стерической доступности фрагментов и связей исследуемой молекулы, т.е. к искажению представления о ее пространственной структуре. Наличие адсорбции и важность ориентации молекул в адсорбционном слое были наглядно продемонстрированы в работе с набором низкомолекулярных поверхностно-активных веществ с длиной углеводородной цепи от C-1 до C-16 [5]. При одинаковых условиях приготовления мишени, т.е. при одинаковых временах существования поверхности жидкости, зависимости включения метки от концентрации вещества в растворе имели вид, типичный для изотерм адсорбции, но после участка насыщения величина удельной радиоактивности уменьшалась. Этот, на первый взгляд, необычный факт, был связан с переориентацией адсорбированных молекул. Если на первой стадии адсорбции поверхность насыщалась молекулами, в основном ориентированными своими углеводородными цепями вдоль границы раздела фаз, то при дальнейшем увеличении концентрации происходило как бы "уплотнение" адсорбционного слоя в результате появления молекул с ориентацией углеводородной цепи по нормали к этой границе. Это приводило, с одной стороны, к увеличению концентрации молекул в слое и соответствующему уменьшению удельной радиоактивности, а с другой – к экранировке групп CH_2 , отдаленных по цепи от концевой метильной группы. Из этих экспериментов, кстати, можно независимым путем оценить эффективную величину пробега горячих атомов трития, которая должна быть порядка линейных размеров метиленовой группы, т.е. 2–3 Å. Эффекты, связанные с адсорбцией растворенного вещества на поверхности, наблюдались также и для аминокислот и дипептидов. В последнем случае ярко проявлялось влияние ориентации молекулы, составленной из аминокислотных остатков разной полярности, на распределение метки. Например, в области, соответствующей образованию насыщенного слоя, в дипептиде глициллейцине, включение метки в

остаток лейцина существенно превышало метку гидрофильного глицина [6]. В настоящее время неясно, в какой мере адсорбционные процессы проявляются в случае макромолекул. Для некоторых белков (лизоцим, α -химотрипсин), действительно, были получены концентрационные зависимости включения метки, аналогичные изотермам адсорбции [7]. Влияния ориентации при этом обнаружено не было. Это может быть связано как с большими временами, необходимыми для ориентации молекул с большой массой в адсорбционном слое, так и с отсутствием в данных белках ярко выраженной асимметрии в расположении на поверхности глобул кластеров гидрофобных и гидрофильных остатков.

Возможность получения информации о достаточно тонких характеристиках структуры адсорбционных слоев открывает новые и пока еще мало исследованные возможности применения метода тритиевой планиграфии. Приступая к исследованию пространственной структуры макромолекул, следует иметь в виду, что пренебрежение возможным вкладом процессов адсорбции без постановки специальных контрольных экспериментов может привести к весьма существенным ошибкам в интерпретации экспериментальных данных. Существуют, однако, другие и, с нашей точки зрения, надежные способы исключить саму возможность протекания адсорбционных процессов. Для этого, очевидно, необходимо уменьшить время существования границы раздела фаз жидкость–газ так, чтобы процесс адсорбции не успевал произойти. Оказалось, что если раствор исследуемого вещества наносить на предварительно охлажденную до 77°K стенку реактора путем "напыления" его из сопла пульверизатора в виде капель с малыми размерами, то за время пролета капли от среза сопла до стенки адсорбция не происходит, а скорость замораживания капли при столкновении с холодной стенкой столь велика, что жидкое состояние на ее поверхности практически не существует. При таком способе приготовления мишени из растворов низкомолекулярных дифильных веществ – аминокислот и дипептидов – концентрационные зависимости включения метки не носили характер изотерм и описывались простым соотношением $A \approx C^{2/3}$, где A – активность образца и C – концентрация вещества в объеме. Расчеты и прямые рентгеноструктурные данные показывают [10], что при диаметре капли 10^{-2} мм и использовании для охлаждения подложки жидкого азота время

охлаждения раствора от 300 до 77 К составляет 10^{-3} – 10^{-4} с и поверхностный слой капли замерзает в виде рентгеноаморфной стеклообразной фазы. Последнее обстоятельство крайне важно, так как кристаллизация воды при замерзании может вызвать существенные нарушения структуры находящегося в растворе объекта. Наиболее критично это для систем, содержащих внутреннюю водную фазу, как, например, липосом, клеток и т.п. Ниже будет показано, что в описанных условиях приготовления мишени путем "напыления" в самом деле не происходит нарушения целостности весьма сложных биологических объектов.

Оригинальный, но требующий определенных навыков способ быстрого замораживания был использован при изучении структуры рибосомы [35]. Авторы получали замороженную суспензию рибосом путем вливания ее по каплям непосредственно в жидкий азот. Получившиеся гранулы льда затем механически растирали в жидком азоте и эту взвесь выливали на боковые стенки реактора. После испарения жидкого азота на стенках оставалась стеклообразная мишень, состоящая из множества "сколов" льда. Как и при распылении раствора, включение метки определялось объемной концентрацией в степени 2/3.

1.4.4. Анализ меченых препаратов

Излишне говорить, что методы анализа вещества-мишени полностью определяются природой исследуемого объекта и, как правило, включают набор стандартных подходов с некоторыми незначительными изменениями, связанными с необходимостью изменения радиоактивности. Вместе с тем существует и некоторая специфика, присущая данному методу введения метки, которая обуславливает необходимость использования некоторых общих для всех объектов методических приемов. Так, независимо от природы вещества-мишени стадии анализа распределения метки должна предшествовать процедура освобождения образца от меченого растворителя и трития в составе групп, способных легко обмениваться с растворителем (водой), – так называемой лабильной метки. К таким группам относятся гидроксильные ($-\text{OH}$), карбоксильные ($-\text{COOH}$), водород азотсодержащих групп ($-\text{NH}_2$, $=\text{NH}$, в том числе и в пептидной связи), водород сульфгидрильных групп ($-\text{SH}$) и т.п. Изотопный обмен в таких группах с водой происходит с большой скоростью уже при обычных температурах (300 К), но в макромолекулах может

быть затруднен, если соответствующие связи стерически недоступны для контакта с молекулами воды. При изменении внешних условий, приводящем к изменению пространственной структуры или внутримолекулярной подвижности (динамической структуры), эти группы могут стать доступными и участвовать в изотопном обмене. На этом, кстати, основан метод исследования динамики макромолекул [1]. Способны к обмену и некоторые другие связи, например в боковых цепях гистидина и триптофана, однако скорость обмена в этих положениях существенно ниже и заметный вклад он вносит лишь при повышенных температурах. Так как уровень лабильной метки существенно – на 2–3 порядка – превышает "устойчивую" метку в C–H-связях, то она должна быть удалена из образца до анализа распределения метки между компонентами системы.

Высокая радиоактивность растворителя (воды) может быть в какой-то мере объяснена преобладанием его молекул на поверхности мишени, однако причины преимущественного включения трития в состав лабильных групп сегодня еще остаются не вполне ясными.

Очевидно, что метка в лабильных положениях не связана с реакциями горячих атомов трития и не ограничивается стерически доступными для прямого столкновения участками (связями). Об этом, например, говорит тот факт, что уровень лабильной метки практически не зависит от энергии бомбардирующих атомов и не снижается при введении инертных замедлителей [13]. Нельзя объяснить высокое содержание трития в лабильной форме и обменом между растворенным веществом и меченым растворителем при размораживании образца. Лабильная метка преобладает и в случае сухих, не содержащих свободной воды системах. Можно предположить, что метка в лабильных группах связана со специфическими свойствами атома водорода (трития), диффундирующего в твердофазной матрице и проникающего, как уже говорилось, на значительную глубину – до 10^{-4} см [20, 21]. Существует гипотеза, согласно которой стабилизированные на поверхности твердого тела атомы водорода приобретают свойства полярной частицы и в такой форме взаимодействуют с молекулами среды по участкам с повышенной электронной плотностью. Такая поляризация атомов водорода наблюдалась по спектрам ЭПР [33]. Похожий механизм предлагается для твердофазного каталитического обмена водорода с органическими

веществами в смеси с металлическими катализаторами, так называемого спилловер-водорода.

Атом водорода при этом рассматривается как частично разделенная пара протон–электрон [22]. Заметим, что при низкой ($T \sim 300$ K) температуре спилловер-водород приводит к метке преимущественно в лабильной, обмениваемой с водой форме [11].

Итак, первая процедура после размораживания или растворения мишени – удаление лабильной метки. Наиболее простой прием, с помощью которого высокомолекулярное вещество может быть освобождено от большей части лабильного трития – диализ против чистого растворителя. Этот процесс, как правило, достаточно долгий и занимает от нескольких часов до суток и позволяет "снять" значительную часть метки, но полностью освободить от нее препарат обычно не удается даже в проточных условиях. Более полное удаление лабильного трития достигается при использовании высокоэффективной жидкостной хроматографии. Повторением хроматографических циклов и использованием сорбентов разного типа удается получать чистые препараты, практически не содержащие метки, способной к обмену с водой в условиях, в которых проводилось хроматографирование [8]. При перенесении препарата в более жесткие условия, например изменяя pH, повышая температуру, добавляя денатурирующие агенты и т.п., вследствие изменения пространственной структуры объекта освобождается дополнительное количество лабильной метки. Отсюда следует непреложное правило, что "отмывка" вещества от лабильной метки должна проводиться в условиях либо тождественных, либо более жестких, чем те, в которых будут проводиться все последующие стадии анализа. Естественно, что это требование сохраняется и при любых других способах очистки.

Хорошо зарекомендовали себя методы хроматографической очистки меченых препаратов, в которых вещество иммобилизуется на твердом носителе и в таком связанном состоянии промывается растворителем или набором растворителей. Разновидностью такого методического приема является специфическая аффинная хроматография, которая позволяет – помимо всего прочего – выделить только ту фракцию препарата, которая сохранила специфическую биологическую активность [9].

Эффективное и достаточно быстрое удаление лабильной метки достигается с помощью электрофореза. Для низкомолеку-

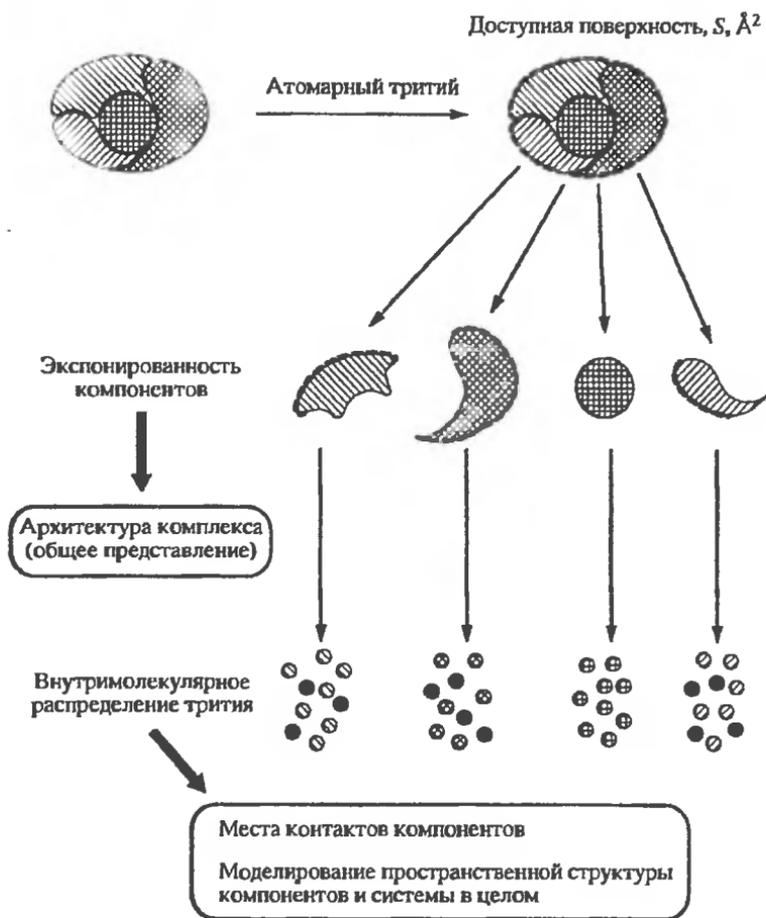


Рис. 1.8. Общая стратегия эксперимента по исследованию пространственной организации макромолекул с четвертичной структурой

лярных веществ это наиболее удобный прием [2]. В ряде случаев для удаления метки могут быть использованы переосаждение, рекристаллизация и другие физико-химические приемы очистки веществ, описанные в соответствующих руководствах. Последующий анализ распределения метки между компонентами исследуемой системы требует сугубо специфических методов и здесь нет необходимости их рассмотрения. С той или иной степенью детальности их описание приводится в последующем материале, посвященном изучению конкретных объектов. Отметим только, что наиболее общая стратегия исследования распределения метки в объекте заключается в последовательном

расщеплении его на все более мелкие фрагменты (рис. 1.8). Так, если исследуемый объект – белок с четвертичной структурой, то на первой стадии проводится разделение его на отдельные макромолекулярные компоненты, последние затем могут быть расщеплены на пептиды, в которых анализируется включение метки в отдельные составляющие их аминокислотные остатки. Для этого может быть использован сиквенс пептида по методу Эдмана (кстати, этот метод может быть использован и для целого белка) или проведен гидролиз пептида до свободных аминокислот и аминокислотный анализ. В последнем случае пептид не должен содержать повторяющихся остатков или их число должно быть минимальным.

Для количественной характеристики включения метки необходимо определить удельные радиоактивности компонентов, для чего обычные методы детектирования количества вещества должны сочетаться с измерением радиоактивности. Методы измерения мягкого β -излучения трития хорошо разработаны и описаны в специальной литературе. Заметим, что в последние годы интенсивно разрабатываются методы и устройства для измерения радиоактивности трития непосредственно в сочетании с хроматографами, что существенно упрощает процедуру анализа меченых соединений и сокращает время анализа.

В связи с широким использованием для разделения и анализа меченых веществ хроматографических методов следует обратить внимание на одну специфическую особенность, пренебрежение которой может привести к ошибочным результатам. Можно предположить, что включение метки в то или иное соединение сопровождается изменением его химической структуры. Такое модифицированное соединение будет получаться в ничтожно малых весовых количествах и потому не определяться обычными детектирующими устройствами, но регистрироваться под радиоактивности. Местоположение этого меченого продукта на хроматограмме может быть близко к положению не меченого, но детектируемого по массе продукта, а так как ширина пика радиоактивности всегда больше, чем пика по массе, то они могут частично налагаться друг на друга. Надежным способом обнаружения такого артефакта может служить постоянство величины удельной радиоактивности по всему "профилю" хроматографического пика.

1.5. Экспериментальные доказательства роли горячих атомов и оценки длины пробега

Все приведенные выше теоретические оценки, как, впрочем, и практически любая теория, могут служить объяснением наблюдательных фактов, но сами по себе требуют достаточно надежного экспериментального подтверждения. В самом деле, аргумент не очевидно, что образовавшиеся на поверхности вольфрама атомы трития имеют температуру, равную температуре нити, и, более того, сохраняют эту температуру до момента столкновения с поверхностью твердой мишени. Нуждается в доказательстве и сама роль горячих частиц в процессах, обуславливающих включение метки. Наконец, только как ориентировочные могут рассматриваться оценки глубины зоны реакции, или пробега горячих атомов в веществе мишени. К сожалению, в настоящее время число экспериментов, результаты которых позволяли бы ответить на эти вопросы, весьма ограничено, что в значительной мере обусловлено трудностями чисто технического характера.

Наиболее однозначно на вопрос о роли горячего механизма в образовании меченых продуктов отвечают, на наш взгляд, эксперименты [13], в которых внутримолекулярное распределение метки в глобулярных белках сравнивалось при двух различных условиях тритиевой бомбардировки: обычных, когда реактор заполнялся чистым молекулярным тритием при давлении, обеспечивающим свободный пробег атомов от нити до мишени, и мишень бомбардировалась пучком горячих частиц и при избытке инертного замедлителя, полностью термализующего горячие атомы. В последнем случае объем реактора заполнялся смесью молекулярного трития и инертного газа – гелия. Причем, если давление трития в обоих опытах было одинаковым, то давление гелия было на 2 порядка выше и составляло 10^{-1} мм рт.ст. При таком давлении длина свободного пробега атомов трития $\lambda \approx 7 \times 10^{-2}$ см и на пути от нити до мишени атом трития испытывает в среднем около 40 столкновений с атомами инертного газа. Близость масс трития и гелия обеспечивает полную термализацию атомов, и их температура вблизи поверхности мишени может считаться равной температуре гелия, т.е. температуре холодной стенки. В качестве мишени в этих опытах использовали белок – лизоцим. Как было показано, термализация атомов три-

тия практически не сказывается на общем уровне включения метки в мишень, но доля лабильной (обмениваемой с водой) метки возрастает более, чем в 50 раз. Еще более показательно то, что коренным образом различались распределения метки (устойчивой, в C–H-связях) по аминокислотным остаткам. Так, если в "горячей" системе максимальная удельная активность наблюдалась для остатков пролина, то в "холодных" условиях подавляющая часть метки была локализована в остатках лейцина, тирозина и треонина. Анализ полученных распределений показал, что, если при введении метки с участием горячих атомов существует четкая корреляция между уровнем удельной радиоактивности и стерической доступностью остатков (последнее – по данным компьютерного моделирования бомбардировки), то для тепловых атомов она полностью отсутствует, а само распределение близко к тому, которое наблюдается при введении метки с помощью так называемой техники радикального захвата в денатурированный лизоцим [32, 33]. В последнем случае фактором, определяющим введение метки, являлась реакционная способность соответствующих аминокислот, а не их стерическая доступность в пространственной структуре глобулы.

Еще сложнее оценить температуру атомов, бомбардирующих поверхность мишени. Прямые физические измерения здесь реализовать весьма сложно, но как своеобразный "химический термометр" может служить сама реакция введение метки. Так, в работе [3] исследовалось введение метки в L-аланин. Отрыв водорода в этой молекуле мог происходить от атомов углерода в α - и β -положениях, причем в первом случае отрыв сопровождался рацемизацией оптически активного изомера. Было установлено, что в α -положение включается 40% трития. В расчете на одну C–H-связь это достигается при отношении констант отрыва $K_\beta/K_\alpha = 0.5$. Принимая для энергий активации отрыва водорода от первичного и вторичного атомов углерода значения соответственно 10.5 и 7.5 ккал/моль [12], получаем, что такое отношение констант может иметь место при температуре атомов 2000 К, т.е. равной температуре нити. К схожим величинам приводят и другие эксперименты, в которых сравнивались вероятности отрыва водорода в метильных и метиленовых группах [5].

Еще более сложно поставить прямые эксперименты для определения длины пробега реакционноспособных атомов трития

в веществе-мишени. Опыты с ориентированными на поверхности раздела фаз молекулами поверхностно-активных веществ [5] показали, что увеличение "толщины" молекулярного слоя на одну метиленовую группу, т.е. на $\approx 3 \text{ \AA}$ снижает включение метки приблизительно в 10 раз. Отсюда для длины свободного пробега получаем $\lambda = 0.8 \text{ \AA}$.

Можно попытаться оценить пробег, используя данные о доступности для введения метки остатков аминокислот в белках с известной пространственной структурой. Так, в миоглобине кашалота [4] два одинаковых остатка валина: Val-1 и Val-10 отличаются по своей доступности. Если первый с N-конца полипептидной цепи Val-1 находится на поверхности белковой глобулы и полностью доступен для атаки атомов трития, то второй Val-10 расположен на стороне α -спирали, спрятанной интерьере глобулы, т.е. как бы погружен в нее на глубину, равную диаметру спирали 5 \AA . По уровню включения метки эти остатки различаются в ~ 30 раз, что приводит к ориентировочной длине пробега $\lambda \sim 0.7 \text{ \AA}$. Как видим, все эти значения хорошо согласуются с оценками, полученными расчетом замедления горячих атомов трития с использованием параметров, принятых в физике атомных столкновений. Это может рассматриваться как еще один аргумент в пользу того, что в тритиевой планиграфии "работает" механизм горячих атомов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абатуров Л.В., Лебедев Ю.О., Молчанова Т.П. и др. Равновесная динамика структуры биополимеров / Ред. Э.А. Бурштейн и Л.В. Абатуров. Пущино: ЦНТИ, 1990. С. 49–77.
2. Баратова Л.А., Гуляев Н.Н., Филатов Э.С., Нестерова М.В., Северин Е.С., Унукович М.С., Шишков А.В. // Радиохимия. 1980. Т. 22. С. 886–889.
3. Баратова Л.А., Румянцев Ю.М., Симонов Э.С., Унукович М.С., Цырапкин В.А., Шишков А.В. // Химия высоких энергий. 1981. Т. 15. С. 370–373.
4. Богачева Е.Н., Мороз А.П., Шишков А.В., Баратова Л.А. // Молекуляр. биология. 1996. Т. 30, № 3. С. 637–646.
5. Вольнская А.В., Скрипкин А.Ю., Шишков А.В., Гольданский В.И. // Докл. АН СССР. 1982. Т. 226. С. 871–874.
6. Гедрович А.В., Бадун Г.А. // Коллоид журнал. 1992. Т. 54, № 3. С. 24–28.
7. Гедрович А.В., Шишков А.В., Вольнская А.В., Джафаров Э.С., Скрипкин А.Ю., Гольданский В.И. // Вода и ионы в биологических системах: III Междунар. конф., Румыния. Бухарест, 1985. С. 159.

8. Гедрович А.В., Гольданский В.И., Румянцев Ю.М., Унукович М.С., Шишков А.В. // *Радиохимия*. 1984. Т. 26. С. 483–494.
9. Гоникберг Э.М., Дегтярев И.А., Унукович М.С. и др. // *Докл. АН СССР*. 1976. Т. 229. С. 112–119.
10. Григорьев В.А., Шишов В.В. / Монохроматическое диспергирование вещества и криодисперсная технология. М.: МЭИ, 1981. С. 25–42.
11. Золотарев Ю.А., Ласкателев Е.В., Козик В.С., Дорохова Е.М., Розенберг С.Г., Борисов Ю.А., Мясоедов Н.Ф. // *Изв. РАН. сер. хим.* 1997. Т. 4. С. 757–762.
12. Кондратьев В.Н. Константы скорости газофазных реакций. Москва: Наука, 1970.
13. Нейман Л.А., Смоляков В.С., Шишков А.В. // *Радиоизотопные методы в физико-химической биологии: Использование реакций атомарного-трития*. М.: ВИНТИ, 1985. С. 130–131. (Итоги науки и техники; Т. 2).
14. Шишков А.В., Филатов Э.С., Симонов Е.Ф., Унукович М.С., Гольданский В.И., Несмеянов А.Н. // *Докл. АН СССР*. 1976. Т. 228. С. 1237–1239.
15. Baker R.T.K., Silbert M., Wolfgang R. // *J. Chem. Phys.* 1970. Vol. 52. P. 1120–1132.
16. Biordi J.C., Rousscer V., Mains G.J. // *Ibid.* 1968. Vol. 49. P. 2642–2651.
17. Englander S.W., Englander J.J. // *Meth. Enzymol.* 1972. Vol. 26C. P. 406–413.
18. Fite W.L., Brackman R.T. // *Phys. Rev.* 1958. Vol. 112. P. 1141–1151.
19. Gann R.J., Ollison W.M., Dubrin J. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1970. Vol. 92. P. 450–454.
20. Henriksen T. // *J. Chem. Phys.* 1969. Vol. 50. P. 4653–4655.
21. Jensen H., Henriksen T. // *Acta chem. scand.* 1968. Vol. 22. V. 2263–2276.
22. Karen E., Soffer A. // *J. Catalysis.* 1977. Vol. 50. P. 43–52.
23. Karplus M., Porter R.N., Sharma R.D. // *J. Chem. Phys.* 1966. Vol. 45. P. 3871–3877.
24. Klein R., Sheer M.D. // *J. Phys. Chem.* 1958. Vol. 62. P. 1011–1014.
25. Kuppermann A., White J.M. // *J. Chem. Phys.* 1966. Vol. 44. P. 4352–4354.
26. Menzinger M., Wolfgang R. // *Ibid.* 1969. Vol. 50. P. 2991–3004.
27. Menzinger M., Wolfgang R. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1967. Vol. 89. P. 5992–5993.
28. Nicholas J.E., Bayrakceken F., Fink R.D. // *J. Chem. Phys.* 1972. Vol. 56. P. 1008–1011.
29. Oldershaw G.A., Porter J.A. // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1972. Vol. 68. P. 709–715.
30. Oldershaw G.A., Smith A. // *Ibid.* 1978. Vol. 74. P. 1687–1692.
31. Papp N., Lee K.P. // *J. Magn Resonance.* 1975. Vol. 19. P. 245–249.
32. Riess P., White F.H. // *Nature.* 1967. Vol. 216. P. 1208–1212.
33. Riess P., White F.H. // *Adv. Chem.* 1968. Vol. 1. P. 496–520.
34. Wright J.S., Gray S.K. // *J. Phys. Chem.* 1979. Vol. 83. P. 1033–1042.
35. Yusupov M.M., Spirin A.S. // *Methods Enzymol.* 1988. Vol. 164. P. 426–439.

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА БЕЛКОВ

Глобулярные белки – первые объекты, к исследованию которых был применен метод тритиевой планиграфии. Приведенные в предыдущей главе характеристики метода, такие как отсутствие продуктов деструкции, локализация метки в фрагментах макромолекулы, доступных для падающих на мишень горячих атомов трития и составляющих периферический слой, позволили поставить следующие задачи.

- 1) препаративное получение меченых препаратов белков;
- 2) определение топографии поверхности белковой макромолекулы на уровне индивидуальных аминокислотных остатков (доступной поверхности);
- 3) исследование пространственной структуры и конформационных переходов в белках;
- 4) моделирование трехмерной пространственной структуры.

Рассмотрение первой задачи выходит за рамки настоящей книги. Полученные в этом направлении результаты изложены в ряде оригинальных работ [14, 20, 30]. Заметим только, и это обстоятельство немаловажно для использования тритиевой планиграфии в структурных исследованиях, что получаемые в результате тритиевой бомбардировки препараты при достаточно высокой удельной радиоактивности для белка средних размеров (10–20 Ки/мМ) полностью сохраняли свою биологическую активность. Существенно, что в тех случаях, когда это было возможно, тестом на сохранение активности служило поведение именно меченой части молекул, например совпадение констант равновесия при образовании фермент–субстратного комплекса, определенных обычными методами и по измерению радиоактивности [25].

Три других аспекта приложения метода тритиевой планиграфии явились принципиально новыми и позволили получить такие результаты, которые не дает ни один из известных "классических" методов.

Так, до недавнего времени данные о периферической области макромолекулы – важнейшей с точки зрения функционирования структурной характеристики, так называемой доступной поверхности, – могли быть получены только на основе данных рентгеноструктурного анализа с атомным разрешением и при введении целого ряда допущений, неизбежных при теоретическом расчете. Его основное ограничение – необходимость иметь исследуемый объект в высокоупорядоченной форме. Получение таких образцов вылилось, по существу, в самостоятельную область науки, причем очень часто успех определяется не столько выполнением установленных правил, сколько искусством экспериментатора. В ряде случаев, отчаявшись получить кристаллы белка из одного источника, исследователь обращается к родственному белку из другого источника. Вопрос – можно ли переносить получаемые таким образом структурные данные на другие, функционально тождественные объекты – не имеет однозначного ответа. В качестве примера можно привести целый ряд белков, получаемых из термофильных организмов *Thermus thermophilus* и дающих хорошие кристаллы, и аналогичных им из *E. coli*, которые не удается закристаллизовать. Часто условия кристаллизации существенно отличаются от условий, в которых функционирует белок. Более адекватная информация может быть получена методами ЯМР, для которых в настоящее время ограничением является молекулярная масса объекта. Это заставляет исследователей для структурного описания объекта использовать целый набор методов, каждый из которых дает лишь ограниченную информацию, но ее суммирование позволяет сделать вывод о структуре в целом. Метод тритиевой планиграфии является ценным дополнением к арсеналу таких методов, а в ряде случаев получаемая с его помощью информация оказывается достаточной для описания трехмерной структуры. Тритиевая планиграфия сегодня – прямой экспериментальный метод определения доступной поверхности.

Кроме того, надо отметить, что метод рентгеноструктурного анализа дает нам "портрет" макромолекулы в одном, фиксированном при условиях кристаллизации состоянии. Его использование для изучения изменений структуры, конформационных переходов в макромолекуле едва ли реально даже в перспективе, так как для этого потребуются получать кристаллические образцы во всех измененных условиях.

Третьею планиграфией, с равным успехом используемая как для кристаллов, так и для растворов, позволяет изучать изменения структуры, а ее высокая чувствительность позволяет фиксировать такие конформационные переходы, которые "не чувствуют" другие методы, включая спектральные.

И наконец, проблема моделирования пространственной структуры биологических макромолекул. Решение этой задачи имеет даже не столько прагматическое значение, позволяя на основании тех или иных теоретических и(или) экспериментальных параметров строить трехмерные модели белков, сколько фундаментальное, так как в основе ее лежит установление общих принципов формирования пространственных структур при синтезе в естественных природных условиях. Хотя сегодня ни у кого не вызывает сомнений тот факт, что пространственная структура белков определяется ("закодирована") последовательностью аминокислотных остатков в полипептидной цепи, установить эту связь и предсказать на ее основе хотя бы общий ход цепи в трехмерном пространстве пока не удалось. Использование метода третичной планиграфии в сочетании с теоретическими подходами было положено в основу построения моделей трехмерных структур на уровне простых глобулярных белков.

2.1. Доступная поверхность

Как уже было указано выше, периферический слой макромолекулы, фрагменты которого доступны для взаимодействия с молекулами окружающей среды, играет ключевую роль во всех процессах функционирования белка в природной системе. Образование фермент-субстратных комплексов, узнавание антигена антителом, формирование сложных четвертичных структур и многие другие процессы, по крайней мере, на начальной стадии требуют контакта частиц друг с другом. Эти контакты опосредуются внешним слоем макромолекул, или, условно говоря, поверхностью. Более того, само образование, существование устойчивой пространственной структуры макромолекулы обусловлено взаимодействием составляющих ее мономерных звеньев и функциональных групп с молекулами воды и растворенными в воде веществами ионной и молекулярной природы. Это обстоятельство не вызывало сомнений и стимулировало многочисленные исследования состава и структуры поверхности. Для этих целей используются подходы, основанные на химической модификации

поверхностных функциональных групп различными реагентами. Разработан ряд типовых приемов и реагентов для выявления различных функциональных групп [56, 59, 62, 63], и их круг постоянно расширяется. Ярким примером может служить титрование сульфгидрильных групп *p*-хлормеркурибензоатом, в результате чего можно определить группы SH, расположенные на поверхности белковой глобулы и "спрятанные" внутри ее. Близко к химической модификации определение доступных функциональных групп путем введения различного рода меток или зондов: парамагнитных [99], флуоресцентных [52, 79]. При этом, кроме сведений о доступности для метки определенной функциональной группы, можно получить данные о характере ближайшего окружения. Важное значение приобрели иммунохимические методы исследования поверхности [37] и водородный обмен [57, 67].

К сожалению, все эти методы позволяют определить только отдельные локальные области доступной поверхности или, наоборот, безадресны (водородный обмен). Кроме того, всегда следует иметь в виду, что любая химическая модификация может привести к тем или иным изменениям пространственной структуры исследуемой макромолекулы. Так, например, модификация одной SH-группы может вызвать конформационный переход, в результате которого станут доступны новые, ранее спрятанные в нативной структуре группы. То же относится и к введению зондов (обычно крупных молекул), вызывающих возмущение нативной структуры и изменение конформации белка.

Понимание структурной и функциональной значимости поверхности макромолекул при ограниченности экспериментальных подходов для ее определения стимулировало развитие расчетных методов, базирующихся на данных рентгеноструктурного анализа с атомным разрешением. Первая работа такого рода, дающая количественное описание поверхности белков, доступной для взаимодействия с молекулами воды, была проведена еще в 1971 г. Ли и Ричардсом [74]. Это поверхность, на которой располагается центр сферической пробы с радиусом 1.4 Å (аппроксимирующей молекулу воды), скользящей по поверхности макромолекулы. При этом макромолекула представляется совокупностью атомов, описываемых ван-дер-ваальсовыми сферами, координаты центра которых определяются по данным рентгеноструктурного анализа высокого разрешения (1–2 Å). Термин

"доступная поверхность" прочно вошел в употребление и широко используется для описания взаимодействий макромолекул с растворителем, лигандами и друг с другом. С целью количественного описания доступной поверхности Ли и Ричардс разработали алгоритм расчета площади доступной поверхности и доступности на уровне отдельных атомов и определили эти величины для трех белков: лизоцима, рибонуклеазы А и миоглобина. Впоследствии такие расчеты были проведены и для ряда других белков по алгоритму Ли и Ричардса [74, 89, 91] или его модификациям [21, 49, 93, 97]. Это позволило провести исследования на достаточно широком круге глобулярных белков и установить некоторые общие закономерности, связывающие площадь доступной поверхности, молекулярную массу, форму белковой глобулы, ее объем и т.п. Сравнение величин площадей доступной поверхности макромолекулы и гипотетически полностью развернутой цепи характеризует компактность глобулы, так называемый коэффициент свернутости. Отношение площадей поверхности реальной глобулы и идеальной геометрической фигуры, соответствующей форме глобулы (например, сферы или эллипсоида вращения), дает количественную характеристику изрезанности рельефа поверхности белка, так называемый коэффициент шероховатости. Сопоставление данных расчета для разных белков позволило установить связь площади доступной поверхности с молекулярной массой, которая для сравнительно небольших белков, форма глобулы которых близка к сферической, имеет вид степенной функции [89]:

$$S = 11.1 M^{2/3}.$$

Не умаляя значимости этих работ, заметим, что ценность полученных результатов существенно возросла бы при их подтверждении экспериментом.

Метод тритиевой планиграфии позволяет получить количественную информацию о доступности составляющих белок фрагментов (аминокислотных остатков) и дает уникальную возможность как проверки закономерностей, установленных расчетом, так и определения соответствующих параметров для объектов, структура которых еще не определена.

На ряде модельных объектов с известной пространственной структурой (аминокислоты, дипептиды и белки: лизоцим, миоглобин, рибонуклеаза А) методом тритиевой планиграфии было по-

Таблица 2.1

Вероятности включения метки (K) в аминокислотные остатки лизоцима, нормированные на единицу площади доступной поверхности углеводовородных фрагментов

Остаток аминокислоты	K^*	Остаток аминокислоты	K^*
K	0.12	P	0.11
H	0.16	A	0.12
R	0.10	V	0.11
D/N	0.10	I	0.10
E/Q	0.20	L	0.08
T	0.10	Y	0.07
S	0.10	F	0.09
G	0.09		

* Среднеквадратичное отклонение 20%.

казано, что между включением метки (A) и площадью доступной поверхности ($S_{\text{дост}}$) существует количественная корреляция: $A = KS_{\text{дост}}$, где K – коэффициент пропорциональности, характеризующий вероятность процесса замещения водорода на тритий в условиях полной доступности соответствующей связи, нормированную на единичную площадь доступной поверхности [9, 15, 29]. Для количественного определения площади доступной поверхности необходимо определить величину K , которая в общем случае должна быть функцией химической природы атакуемой связи. С этой целью были проведены эксперименты со свободными аминокислотами и их смесями, короткими пептидами (в основном, дипептидами) и модельными белками [1, 12, 15]. В табл. 2.1 приведены калибровочные коэффициенты для включения метки в отдельные аминокислотные остатки в молекуле лизоцима [9].

Оказалось, что в условиях одинаковой стерической доступности на включение метки не оказывают влияние соседние по цепи аминокислотные остатки и нахождение данного остатка на N- или C-конце полипептидной цепи. Включение метки в остатки аминокислот разной химической природы происходит приблизительно с одинаковыми вероятностями в расчете на одну C–H-связь или на единицу площади доступной поверхности (см. табл. 2.1).

Возможность прямого и технически достаточно простого определения общей площади доступной поверхности была продемонстрирована на ряде белков: рибонуклеазе S, лизоциме, мио-

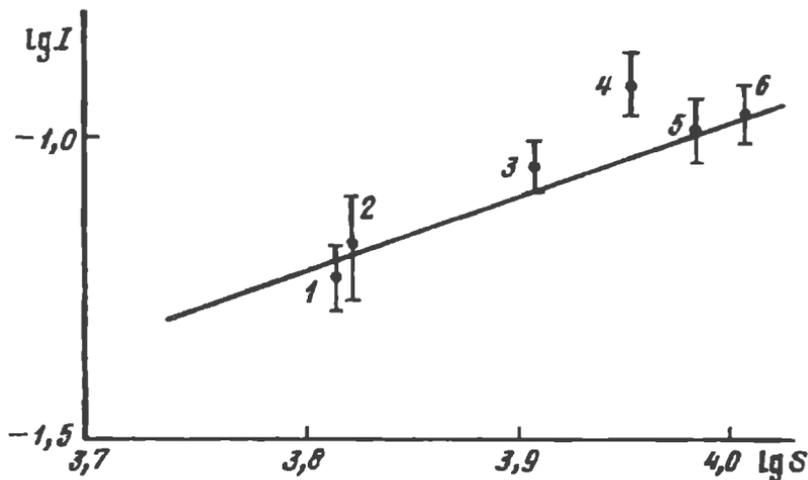


Рис. 2.1. Зависимость приведенной радиоактивности от площади доступной поверхности белков

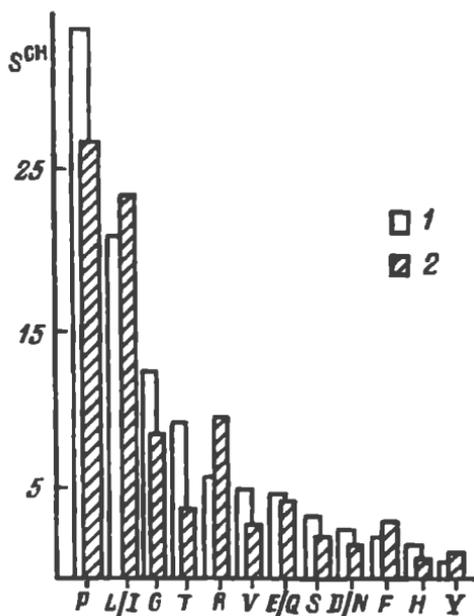
1 – лизоцим, 2 – рибонуклеаза S, 3 – миоглобин, 4 – папаин, 5 – субтилизин BNP, 6 – α-химотрипсин

глобине, α-химотрипсине, субтилизине, термолизине, карбокси-пептидазе A [13] (рис. 2.1). Как и следовало из расчетов доступной поверхности, включение метки оказалось линейной функцией логарифма молекулярной массы белка $A = k \lg M$, причем $k = 0.67$, что хорошо совпадает с установленной для глобулярных белков теоретической зависимостью с молекулярной массой: $S = 11.1 M^{2/3}$. Заметим, что эту зависимость можно использовать и определять соответствующие структурные характеристики для неизвестных белков. Такого рода работа была проведена с парвальбумином щуки Ш [13] и было получено, что площадь доступной поверхности $S = (5700 \pm 900) \text{ \AA}^2$. Аппроксимация белковой глобулы сферой с учетом коэффициента шероховатости [89] дала радиус молекулы равный 15 \AA , что хорошо согласуется со средним стоксовым радиусом 14.9 \AA , определенным по данным ЯМР [53]. Использование эмпирической зависимости величины площади доступной поверхности от молекулярной массы M ($S = 6.3 M^{0.73}$) приводит к близким значениям – 5800 \AA^2 [82]. На основании пропорциональности включения тритиевой метки и площади доступной поверхности определена также общая площадь доступной поверхности, приходящаяся на углеводородные фрагменты белка, равная 2474 \AA^2 .

Таким же путем была определена площадь доступной поверхности для сывороточного альбумина человека – $49\,000\text{ \AA}^2$ [9, 95]. Это величина существенно превышает ту, которая должна была бы быть для белка сферической формы ($\approx 18\,000\text{ \AA}^2$), и указывает на "ажурность" его пространственной структуры. Плотность упаковки полипептидной цепи, определяемая как отношение площади глобулы к площади гипотетической развернутой цепи, равна 0.48, а коэффициент шероховатости, характеризующий отличие реальной поверхности от гладкой геометрической фигуры (эллипсоид в данном случае), составляет величину 2.7. Заметим, что для лизоцима площадь доступной поверхности глобулы составляла 7100 \AA^2 и форма ее была близка к сфере, а коэффициенты плотности упаковки и шероховатости составляли 0.69 и 1.7 соответственно [9]. Существенно отличается от типичных плотноупакованных водорастворимых глобулярных белков и аминокислотный состав доступной поверхности сывороточного альбумина, в котором около 63% площади приходится на долю гидрофобных остатков (в случае лизоцима – лишь 18%). В сочетании с информацией о рыхлой упаковке и высоким коэффициентом шероховатости это говорит о наличии в глобуле полостей, образованных остатками гидрофобных аминокислот. Последнее хорошо согласуется с известным высоким сродством сывороточного альбумина человека к крупным молекулам гидрофобных лигандов, таких как жирные кислоты, ароматические углеводороды, органические красители и т.п. Вывод о рыхлости упаковки глобулы альбумина совпадает также с представлениями о гибкости этой молекулы.

Сравнительное изучение доступных поверхностей, одинаковых по функциям, но отличающихся по свойствам белков, может привести к весьма важным выводам о нюансах их структуры. Так, например, при исследовании аминоксил-тРНК-синтазы – одного из ключевых ферментов биосинтеза – из двух источников *E. coli* и *Thermus thermophilus* удалось с помощью тритиевой планиграфии выявить отличия в составах поверхности этих белков при сходных четвертичных структурах [3, 34]. На структурное подобие, по крайней мере, областей активных центров этих ферментов указывает то, что термофильный фермент катализирует реакцию аминокислотирования тРНК из *E. coli*, а фермент из *E. coli* способен катализировать аминокислотирование термофильной тРНК. Поэтому метод тритиевой планиграфии –

Рис. 2.2. Аминокислотный состав доступной поверхности фенилаланил-тРНК-синтетаз из *E. coli* (1) и *Thermus thermophilus* (2), выраженный в процентах от общей площади молекулы



один из немногих возможных способов исследования структуры поверхности фермента из *E. coli* и сравнения ее с поверхностью аналогичного термофильного белка. На рис. 2.2 для этих двух белков представлены гистограммы, показывающие величины площадей доступной по-

верхности углеводородных фрагментов в аминокислотных остатках различного типа. Обнаружено увеличение вклада гидрофобных остатков в суммарную площадь доступной поверхности при переходе от мезофильного к термофильному ферменту. Повышенная доступность в термофильном белке остатков аргинина, входящего в состав нуклеотидузнающих остатков аминоксил-тРНК-синтетаз, позволила Бобковой с соавт. [3, 34] выдвинуть гипотезу, объясняющую возрастание экспонированности на поверхности молекулы заряженных остатков стремлением термофильной тРНК-синтетазы компенсировать дестабилизирующее действие высокой температуры путем введения дополнительных электростатических взаимодействий с субстратом. Структура фермента из *Thermus thermophilus* недавно расшифрована с помощью рентгеноструктурного анализа с разрешением 2.9 Å [84] и высокая доступность остатков аргинина была подтверждена. Получить кристаллы фенилаланил-тРНК-синтетазы из *E. coli* пока не удалось.

Интересные возможности открываются при применении метода тритиевой планиграфии к макромолекулам, обладающим четвертичной структурой. Ниже в отдельных главах будут рассмотрены результаты, полученные при исследовании сложных

нуклеопротеидных комплексов и белков в составе мембран. Относительно простыми объектами являются белки, состоящие из комплексов субъединиц. Если объект можно "разобрать" на составляющие макромолекулярные компоненты и разделить их, подвергнув каждый из них бомбардировке атомарным тритием, можно определить не только доступную поверхность и сделать соответствующее заключение об их структуре, но и сопоставив поверхности индивидуальных компонентов и комплекса в целом, определить области контакта между субъединицами.

Первое такое исследование было проведено с нитрогеназой азотобактера – ферментом, катализирующим восстановление молекулярного азота [2, 20]. Этот белок состоит из двух компонентов, получивших название Fe-белок и MoFe-белок. Первый включает две идентичные субъединицы с молекулярной массой 62 кДа; MoFe-белок является тетрамером типа $2\alpha 2\beta$ с массами 52 и 60 кДа соответственно. Данные тритиевой планиграфии свидетельствовали о развитой поверхности глобулы Fe-белка (площадь которой составляла величину порядка $7 \cdot 10^4 \text{ \AA}^2$) и высокой степени экспонированности остатков гидрофобных аминокислот. Обращает на себя внимание высокая доступность остатков цистеина, подтверждающая предположение об их роли в каталитической активности Fe-белка в АТФазной реакции. Доступность цистеинов была показана и титрованием этих остатков *p*-хлормеркурибензоатом. Большие значения как площади доступной поверхности, так и гидрофобности были обнаружены также и для MoFe-белка ($11 \cdot 10^4 \text{ \AA}^2$), однако если структура Fe-белка достаточно ажурна (коэффициент свернутости ≈ 0.6), то MoFe-белок по плотности упаковки полипептидной цепи близок к таким типичным глобулярным белкам, как лизоцим. Высокая гидрофобность поверхности двух субъединиц нитрогеназы, по всей видимости, важна для образования ее четвертичной структуры. Образование комплекса приводит к существенному уменьшению доступности остатков цистеина, треонина и серина в Fe-белке и остатков цистеина, аланина и в меньшей степени серина, метионина и аргинина в MoFe-белке (табл. 2.2).

Расположение остатков цистеина на поверхности контакта субъединиц согласуется с представлениями об их роли в функционировании нитрогеназы и участии в транспорте электрона с Fe-белка на MoFe-белок в сопряженной реакции гидролиза АТФ до АДФ и фосфора.

Таблица 2.2

Распределение метки (в относительных единицах)
между аминокислотными остатками Fe-белка,
MoFe-белка и нитрогеназного комплекса

Остаток аминокислоты	Распределение метки			
	Изолированные компоненты		Комплекс	
	Fe-белок	MoFe-белок	Fe-белок	MoFe-белок
Cys	21.9	23.8	2.0	0.4
Asx	1.4	1.6	0.7	0.6
Thr	7.9	1.3	2.1	1.8
Ser	7.5	7.0	1.3	0.6
Glx	0.7	0.6	1.0	1.6
Pro	0.8	0.0	4.8	10.5
Gly	2.2	1.1	1.5	1.5
Ala	3.8	20.9	3.4	3.2
Val	8.3	9.5	34.7	38.6
Met	6.4	8.7	15.6	1.6
Ile	16.4	10.8	5.5	5.7
Leu	6.6	5.4	13.5	22.4
Lys	0.5	0.0	0.0	0.0
Phe	4.6	3.5	4.6	4.6
His	8.0	0.0	0.0	1.6
Arg	2.7	5.6	5.3	1.9
Tyr	0.0	0.0	3.5	3.3

Другой объект с четвертичной структурой, исследованный методом тритиевой планиграфии, – цитохромоксидаза сердечной мышцы быка, представляющая собой терминальный фермент дыхательной цепи живой клетки [17, 26]. Этот трансмембранный белок состоит из 12 различных полипептидов с молекулярными массами от 5 до 50 кДа. Мечение фермента и его комплекса с цитохромом *c* (в виде молекулярных кристаллов) позволило определить степень экспонированности отдельных участков поверхности цитохромоксидазы. Показано, что при образовании фермент-субстратного комплекса происходит уменьшение доступности полипептидов I и II на 40%, полипептида VIc на 30% и полипептидов VIIa–VIIc на 20%. Доступность для трития остальных субъединиц остается неизменной. Участие в образовании комплекса субъединиц I, II, VIc и VIIa–VIIc хорошо согласуется с результатами работы [65], в которой изучено связывание цитохромоксидазы из печени свиньи с цитохромом *c* и показано, что

в нем участвуют карбоксильные группы ее субъединицы II, VIc и VIIb.

В обоих рассматриваемых примерах комплексы (четвертичные структуры) образованы контактами двух и более макромолекул. Можно предположить, что аналогичным подходом можно воспользоваться и при выявлении участков связывания низкомолекулярных лигандов и присоединения субстратов к ферментам. Участок связывания в этом случае будет, естественно, значительно меньше, и для точной локализации мест связывания может потребоваться анализ доступности на уровне индивидуальных остатков в полипептидной цепи, но это не является принципиальным препятствием. Нельзя, однако, не отметить более существенный фактор, пренебрежение которым может привести к заведомо неправильным выводам. При выявлении мест контактов по изменению доступной поверхности предполагалось, что структура молекулярных компонентов при образовании комплекса не претерпевает изменений. Это утверждение далеко не бесспорно, и имеется ряд фактов, указывающих на то, что даже присоединение малого лиганда может вызвать изменение конформации всей макромолекулы.

Примером этого может служить исследование связывания лизоцимом додецилсульфата натрия (SDS) в области малых (10^{-6} – 10^{-5} М) концентраций, при которых одна молекула белка связывается с двумя молекулами додецилсульфата [24]. Образующийся комплекс белок:2 SDS устойчив и может быть выделен хроматографически. Сравнение включения метки в молекулу додецилсульфата натрия в свободном состоянии и в составе комплекса показало, что при связывании на порядок уменьшается доступность углеводородной части молекулы SDS. Это указывает на то, что практически вся углеводородная цепочка этого лиганда иммобилизована внутри белковой глобулы. Такая структура комплекса была подтверждена рентгеноструктурным анализом (редкий случай, когда удалось получить в кристаллической форме как исходный белок, так и комплекс белка с лигандом) [64].

Существенно, что ни один из обычных методов, включая и рентгеноструктурный анализ, не обнаружил каких-либо изменений конформации белка в результате связывания SDS и других детергентов. По данным тритиевой планиграфии, доступная поверхность глобулы претерпевает существенные изменения,

масштаб которых не позволяет отнести их только к локальной области, ближайшей к центрам связывания. Имобилизация двух молекул SDS приводит к увеличению общей площади доступной поверхности, причем в первую очередь возрастает доступность гидрофобных остатков: аланина, валина, пролина, лейцина, изолейцина и фенилаланина (примерно в три раза). Авторы работы [11] интерпретировали обнаруженный конформационный переход как общее "разрыхление" плотноупакованной глобулы белка, приводящее к экспонированности ее гидрофобного ядра.

В рассмотренном примере взаимодействие белка с низкомолекулярным лигандом, по сути дела, не является специфическим. Можно предположить, что образование прочных фермент-субстратных комплексов будет сопровождаться более значительными изменениями конформации всей белковой глобулы. Подтверждением этому могут служить расчеты, полученные при исследовании связывания Fe-белком нитрогеназы азотобактера специфических (АТФ) и неспецифических (АМФ, АДФ) субстратов [2, 10]. Известно, что связывание АТФ-специфического субстрата Fe-белка приводит к увеличению числа доступных для титрования сульфгидрильных групп, повышению чувствительности к кислороду и доступности негемового железа для комплексообразующих реагентов. В значительно меньшей степени эти изменения сопровождалось связыванием АДФ, а при связывании АМФ изменений вообще не наблюдалось. В табл. 2.3 приведены данные по влиянию связывания аденозинфосфатов на доступность аминокислотных остатков. Видно, что связывание всех трех субстратов в той или иной степени влияет на доступность аминокислотных остатков для включения тритиевой метки. Доступность остатков цистеина в комплексе с АТФ возрастает почти в пять раз, в присутствии АДФ – в 1.5 раза. АМФ не влияет на доступность, что хорошо согласуется с данными титрования.

Как видно, даже связывание низкомолекулярного лиганда вносит существенные изменения в пространственную структуру макромолекулы. Более чем вероятно, что ассоциация макромолекул будет сопровождаться не менее значительными структурными перестройками. Так, например, существует точка зрения, что образование комплекса антиген-антитело, т.е. двух макромолекул, должно включать стадию "подстройки" комплементарных поверхностей, а последняя скорее всего затронет и всю струк-

Таблица 2.3

Влияние связывания специфического (АТФ) и неспецифических (АДФ, АМФ) субстратов на доступность аминокислотных остатков в Fe-белке нитрогеназы азотобактера.

($A_{\text{нат}}$, $A_{(\text{АТФ})}$, $A_{(\text{АДФ})}$, $A_{(\text{АМФ})}$) – средние удельные радиоактивности остатков без субстрата и в комплексе с аденозиннфосфатами)

Остаток аминокислоты	$A_{\text{нат}}/A_{(\text{АТФ})}$	$A_{\text{нат}}/A_{(\text{АДФ})}$	$A_{\text{нат}}/A_{(\text{АМФ})}$
Cys	4.84	1.56	1.17
Asx	0.14	0.54	0.75
Thr	0.15	0.18	0.14
Ser	0.05	0.17	0.30
Glx	1.56	0.79	0.83
Pro	4.06	1.00	0.00
Gly	1.00	0.56	0.73
Ala	0.48	0.87	0.60
Val	0.11	0.28	1.84
Met	0.11	–	1.10
Pe	0.09	0.11	0.40
Leu	8.9/0	0.32	1.02
Lys	51.6/0	0.24/0	0.08/0
Phe	1.58	0.12	1.08
His	0.49	0.05	0.42
Arg	2.68	1.36	0.54
Tyr	8.9/0	0.9/0	0.30/0

туру. Трудно ответить, как учесть вклад таких перестроек в эксперименте по определению областей контактов, но возможность их необходимо иметь в виду при интерпретации получаемых данных.

До сих пор термин "доступная поверхность" использован при описании данных, получаемых методом тритиевой планиграфии. Между тем, следует иметь в виду, что как доступность, так и доступная поверхность, зависят от характеристик тестирующей частицы, в первую очередь от ее формы и размеров. В определении Ли и Ричардса доступная поверхность представляет собой совокупность атомов и атомных групп, доступных для ван-дер-ваальсового контакта с молекулой воды, аппроксимируемой сферой радиусом 1.4 \AA [74]. Аргумент ясно, что доступность будет тем больше, чем меньше размеры тестирующей частицы, и, например, для электрона окажутся доступными практически все атомы макромолекулы. Напротив, для такой крупной частицы, как антитело, число доступных атомов и групп существенно уменьшится. Изменение состава и величины доступной поверх-

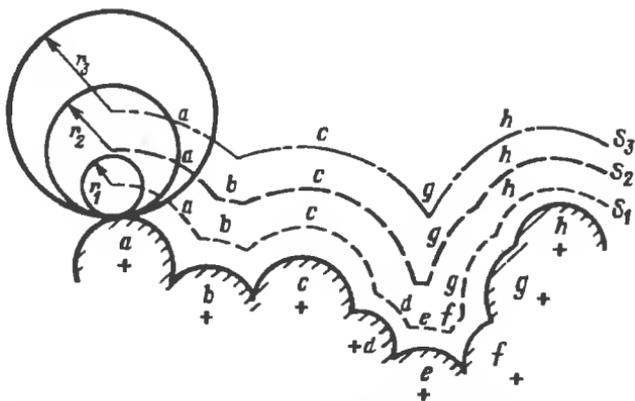


Рис. 2.3. Изменение состава доступной поверхности белка при варьировании радиуса тестирующей пробы $r_1 < r_2 < r_3$

$a-h$ – ван-дер-ваальсовы атомы на поверхности макромолекулы: $r_1(a, b, c, d, e, f, g, h)$, $r_2(a, b, c, g, h)$, $r_3(a, c, g, h)$

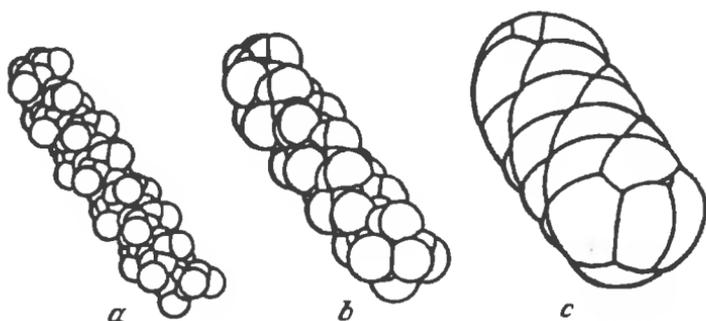


Рис. 2.4. Доступная поверхность α -спирали из 26 остатков аланина при различных размерах пробы [61]. Ван-дер-ваальсова поверхность, $r = 0.1 \text{ \AA}$ (а); проба, аппроксимирующая воду, $r = 1.4 \text{ \AA}$ (б); проба размером 10 \AA (с)

ности с ростом радиуса тестирующей частицы представлено на рис. 2.3. Поверхность одной и той же α -спирали, состоящей из 26 остатков аланина, доступная для частиц различных размеров, изображена на рис. 2.4.

Для интерпретации в этих терминах экспериментальных данных тритиевой планиграфии необходимо определить место атома трития среди этих проб, т.е. размеры той сферы, которой можно описывать атом, а также установить взаимосвязь между доступностью для трития, воды и других частей. Для атома водорода имеется целый набор величин "радиусов" в зависимости от

использованного метода определения: от 0.5 до 1.2 Å. Чтобы определить радиус атома трития, авторы работы [5] обратились непосредственно к эксперименту. Предварительно был разработан и апробирован алгоритм расчета доступной поверхности, включающий следующие основные стадии:

1) макромолекула представляется как совокупность атомов, аппроксимируемых ван-дер-ваальсовыми сферами;

2) ван-дер-ваальсовы радиусы атомов (R_a) увеличиваются на радиус тестирующей пробы (R_p) и эффективная поверхность ($R = R_a + R_p$) рассекается параллельными плоскостями по одной из координатных осей на слои толщиной h . Шаг разбиения (h) выбирается таким образом, чтобы через каждую сферу проходило не менее 10 сечений;

3) для каждого атома в плоскости сечения определяются ближайшие соседи, т.е. атомы, находящиеся на расстоянии l , меньшем суммы эффективных радиусов этих атомов:

$$l_{a_1-a_n} < R_{a_1} + R_{a_n} + 2R_p \quad (1)$$

где R_a и R_{a_1} – радиусы атомов, $l_{a_1-a_n}$ – расстояние между их центрами;

4) окружности атома и контактирующих с ним соседей в плоскости сечения разбиваются на дуги длиной

$$L = 2\pi r_a G / 360, \quad (2)$$

где G – длина дуги в градусах, r_a – радиус окружности в плоскости сечения;

5) для граничных точек каждой дуги проверяется критерий доступности; при

$$P = [(x_i - x_n)^2 + (y_i - y_n)^2]^{1/2} < R_n + 2R_p, \quad (3)$$

где x_i, y_i – координаты граничных точек, x_n, y_n – координаты центра соседнего атома, дуга считается недоступной и исключается из расчета;

6) проводится подсчет числа образовавшихся на поверхности сферы многоугольников, опирающихся на соответствующие доступные, согласно критерию (3), дуги (сферические многоугольники). Площадь доступной поверхности атома получается суммированием площадей доступных многоугольников по всем сечениям атома:

$$S = \sum_{ij} S_{mj} n_i, \quad (4)$$

где S_{mj} – площадь одного сферического многоугольника, j – число доступных многоугольников между соседними сечениями, n_i – число параллельных сечений данного атома;

7) величина доступности определяется по аналогии с расчетом Ли и Ричардса [74] как отношение площади доступной поверхности атома в структуре макромолекулы к полной площади изолированной сферы:

$$D = 100 \cdot S_{\text{дост}} / 4\pi(R_a + R_p)^2 (\%). \quad (5)$$

Координаты атомов белков берутся из банка пространственных структур [33], ван-дер-ваальсовы радиусы атомов – из работы Бонди [36]:

$$R_C = 1.70 \text{ \AA}, \quad R_{O(\text{карбонил})} = 1.52 \text{ \AA}, \quad R_{NH} = 1.55 \text{ \AA},$$

$$R_{C(\text{карбонил})} = 1.80 \text{ \AA}, \quad R_{\text{псс атомы боковой цепи}} = 1.80 \text{ \AA}.$$

Алгоритм расчета достаточно близок к алгоритму, предложенному Ли и Ричардсом, но отличается от него способом расчета доступности и расчета площади доступной поверхности атома: вычисляется доступность участков сферической поверхности – ячеек, заключенных между двумя ближайшими "параллелями" и "меридианами" по доступности для тестирующей пробы узловых точек. В алгоритме Ли и Ричардса определяются длины дуг, образовавшихся при разбиении всей макромолекулы параллельными плоскостями и доступных для сферической пробы; определение доступности дуг проводится в графическом режиме. Это дает более высокую точность результата, но одновременно существенно увеличивает время расчета. В данном случае точность, равная 3% (эта величина зависит от выбранного числа узловых точек и может варьироваться), достаточна для сопоставления расчета с экспериментом (точность последнего, как правило, составляет 10–20%). Оба алгоритма приводят к близким результатам. Сопоставление данных расчета [5] для $R_p = 1.4 \text{ \AA}$ (молекула воды) с опубликованными в работе Ли и Ричардса [74] для лизоцима, рибонуклеазы и миоглобина показало, что расхождение не превышает нескольких процентов.

Для определения эффективного радиуса трития был проведен эксперимент со сравнительно небольшим белком – лизоцимом, для которого имеются данные рентгеноструктурного анализа с высоким разрешением [5] и, соответственно, может быть про-

веден расчет доступности. В этом случае включение метки было определено на уровне отдельных остатков аминокислот, для чего меченый препарат после удаления лабильного трития и восстановления дисульфидных связей гидролизовали трипсином [52, 94, 98]. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии удалось выделить 13 пептидов, которые затем были прогидролизованы до аминокислот. Смесь аминокислот разделяли и определяли удельные радиоактивности каждой из них. В результате получалось распределение метки практически по всей полипептидной цепи или профиль доступности, который уже можно сопоставить с расчетом и найти величину радиуса пробы, при которой будет наблюдаться наилучшее сходжение с экспериментом (рис. 2.5,а). Очевидно, что это и будет соответствовать эффективному радиусу трития. Описанный алгоритм был использован для расчета доступности остатков для проб с радиусами от 0.1 до 2.0 Å и для 10 Å. При этом учитывали еще одну особенность определения доступности методом тритиевой планиграфии, а именно то, что включение метки происходит в углеводородные группы остатка. Доступность групп, в которых нет водорода или водород легко обменивается с водой (лабильная метка), в этом случае не определяется. Для установления корреляции между доступностью остатка в целом и его углеводородной цепочки расчет проводился для всех атомов в остатке ($S_{\text{дост}}$) и только для атомов углерода ($S_{\text{СН}}$) в группах CH , CH_2 , CH_3 . Результаты расчета показаны на рис. 2.6. Видно, что в области малых значений радиусов (0.1–1.0 Å) площадь доступной поверхности резко снижается (примерно на 40%) при увеличении радиуса пробы, что связано со сглаживанием рельефа поверхности. Начиная с радиуса $R_p = 1.0$ Å, значение $S_{\text{дост}}$ остается практически неизменным и лишь для очень больших проб ($R_p = 10$ Å) вновь увеличивается из-за увеличения радиуса траектории "скольжения". Общая площадь поверхности лизоцима для пробы с радиусом 1.4 Å, моделирующей молекулу воды, составила 6500 \AA^2 , что близко к величине, полученной Ли и Ричардсом (6710 \AA^2). Аналогичная зависимость от радиуса пробы была получена и в работе других авторов [60] для миоглобина и легмиоглобина при расчете по программам Ричмонда [90] и Конноли [42].

Подобным образом зависит от радиуса пробы и площадь доступной поверхности глобулы, составленная из углеводородных фрагментов (см. рис. 2.6, кривая 2).

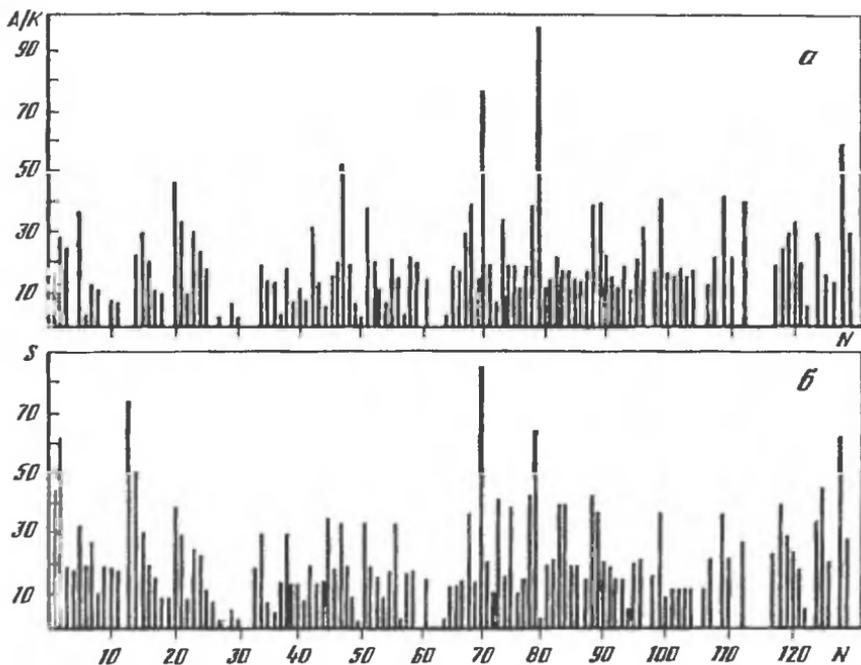


Рис. 2.5. Профиль доступности полипептидной цепи лизоцима

а – распределение тритиевой метки; *б* – расчет для пробы радиусом $R_p = 0.9 \text{ \AA}$; *A* – удельная радиоактивность остатка; *K* – вероятность включения метки, нормированная на единицу поверхности, *S* – площадь доступной поверхности, рассчитанная по приведенному в данной работе алгоритму

Зависимость площади доступной поверхности индивидуальных аминокислотных остатков от радиуса пробы оказалась более сложной, причем определяющим фактором явилась степень их доступности в третичной структуре [5]. Из-за взаимной компенсации различий отношение суммарных величин $S_{\text{СН}}/S_{\Sigma}$, характеризующих глобулу в целом, в интервале значений R_p от 0.1 до 2.0 \AA практически не зависит от радиуса пробы и в случае лизоцима и составляет 0.4 ± 0.06 .

Для определения эффективного радиуса атома трития проводили сопоставление распределения метки в эксперименте с расчетом для проб различного радиуса. В качестве критерия сходимости использовали функцию невязки вида:

$$Q = \sum_i \sum_j (A_i / \bar{A}_j - S_i / \bar{S}_j)^2,$$

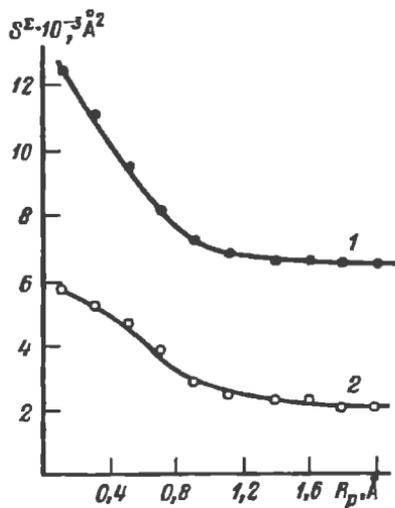


Рис. 2.6. Зависимость площади доступной поверхности глобулы лизоцима S^Σ от радиуса тестирующей пробы R_p

1 – общая площадь доступной поверхности $S^\Sigma_{\text{дост}}$; 2 – площадь доступной поверхности углеводородных фрагментов $S^\Sigma_{\text{дост}}^{\text{С-Н}}$

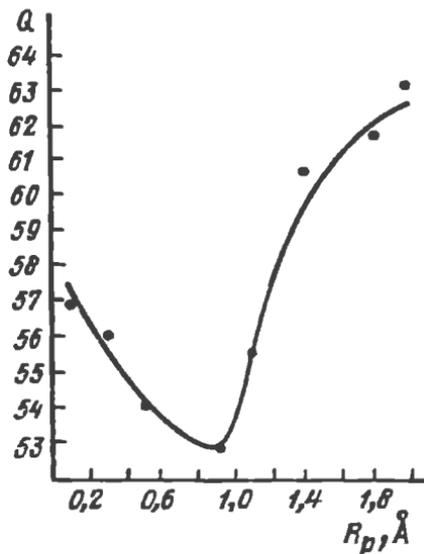


Рис. 2.7. Функция "невязки", характеризующая расхождение расчета с экспериментом для различных радиусов тестирующей пробы

Минимуму функции соответствует эффективная величина радиуса атома трития ($R_p = 0.9 \text{ \AA}$)

где A_i и S_i – удельные радиоактивности и площади доступной поверхности остатка i , \bar{A}_j и \bar{S}_j – величины удельной радиоактивности и площади доступной поверхности остатков i -того типа, усредненные по их числу j в молекуле (см. рис. 2.7). Четко выраженный минимум функции при радиусе пробы 0.9 \AA дает величину эффективного радиуса трития, которую можно использовать при интерпретации данных по включению метки в терминах доступной поверхности. На рис. 2.5,а, б приведены профили доступности полипептидной цепи лизоцима, определенные экспериментально и рассчитанные для сферической пробы с радиусом 0.9 \AA . Оба распределения хорошо совпадают друг с другом. Полученные данные о доступности для атома трития могут быть достаточно надежно экстраполированы на пробы с большим радиусом, вплоть до 2 \AA , для остатков аминокислот с высокой и

Таблица 2.4

Соотношение площадей доступной поверхности углеводородных фрагментов ($S_{\text{СН}}^{\Sigma}$) и полной доступной поверхности аминокислотных остатков ($S_{\text{дост}}^{\Sigma}$) для пробы радиусом 0.9 Å

Остаток	$K = S_{\text{СН}}^{\Sigma} / S_{\text{дост}}^{\Sigma}$	Остаток	$K = S_{\text{СН}}^{\Sigma} / S_{\text{дост}}^{\Sigma}$
L	0.66 ± 0.22	K	0.43 ± 0.10
V	0.78 ± 0.09	S	0.41 ± 0.16
A	0.69 ± 0.31	G	0.31 ± 0.04
C	0.41 ± 0.03	F	0.77 ± 0.15
Y	0.54 ± 0.01	P	0.87 ± 0.04
I	0.69 ± 0.07	D	0.16 ± 0.03
R	0.22 ± 0.09	N	0.14 ± 0.07
T	0.75 ± 0.21	E	0.21 ± 0.04
H	0.55 ± 0.08	Q	0.14 ± 0.08

средней доступностью. В случае малодоступных остатков интерпретировать данные о включении метки следует с осторожностью, так как остатки, доступные для атомов трития, могут оказаться недоступными для молекул воды. Вклад остатков с низкой степенью доступности нивелируется при определении суммарной площади белковой глобулы, что важно иметь в виду при изучении сложных многосубъединичных комплексов.

Таким образом, между доступностью всех атомов в остатке и атомов, составляющих углеводородный "скелет", во всяком случае для пробы с радиусом 0.9 Å, существует корреляция, и с достаточной точностью могут быть определены коэффициенты, позволяющие перейти от площади доступной поверхности для включения тритиевой метки к площади, рассчитанной для ван-дер-ваальсовых контактов.

В табл. 2.4 представлены коэффициенты для перехода от доступности углеводородных фрагментов к доступности остатков в целом для пробы радиусом 0.9 Å. Эти значения действительны и для проб радиусом до 2.0 Å в случае остатков с высокой и средней доступностью.

То, что вероятность включения метки коррелирует с доступностью или площадью доступной поверхности, рассчитанной по алгоритму "обкатки" тестирующей пробы по ван-дер-ваальсовой поверхности макромолекулы, а при использовании определенного выше эффективного значения радиуса трития достигается и

количественное совпадение эксперимента с радиусом, на самом деле не основывается на реальной физической картине эксперимента. Условия бомбардировки пучком атомарных частиц, естественно, отличаются от скольжения такой же частицы по поверхности, хотя, безусловно, определенная пропорциональность между доступностями в обоих случаях существует. Так, например, включение метки обусловлено столкновением данного фрагмента макромолекулы только с первичным, падающим на поверхность атомом трития. Движение атома соответствует прямолинейной траектории, и на поверхности могут существовать области, доступные для скользящей по поверхности пробы, но недоступные для первичной частицы. К таковым, например, могут быть отнесены боковые поверхности полостей и углублений на поверхности (рис. 2.8).

2.1.1. Доступная поверхность и динамика структуры

Доступная поверхность и ее параметры, независимо от алгоритма ее описания: как ван-дер-ваальсовой поверхности, по которой "скользит" сферическая проба [74], или как мишени, бомбардируемой атомарным тритием [7], полностью определяется координатами атомов, составляющих макромолекулу. Можно предположить, что смещение атомов от положения равновесия, например вследствие тепловых движений, должно в той или иной степени проявляться и в характеристиках доступной поверхности. В самом деле, компьютерным моделированием на примере белка – бычьего панкреатического ингибитора трипсина – было показано, что учет колебаний атомов, или внутримолекулярной динамики, существенно сказывается на доступности отдельных аминокислотных остатков (как в сторону увеличения, так и уменьшения) и на величине общей площади доступной поверхности белковой глобулы [76]. Расчет, разумеется, потребовал введения ряда предположений, из которых наиболее существенным был выбор вида функции, описывающей динамику системы.

Метод тритиевой планиграфии позволил провести прямую экспериментальную проверку влияния внутримолекулярных движений на доступную поверхность белка [4].

В качестве объекта исследования был выбран лизоцим куриного яйца. Определяли включение метки в аминокислотные остатки, усредненное для каждого вида аминокислоты, как функ-

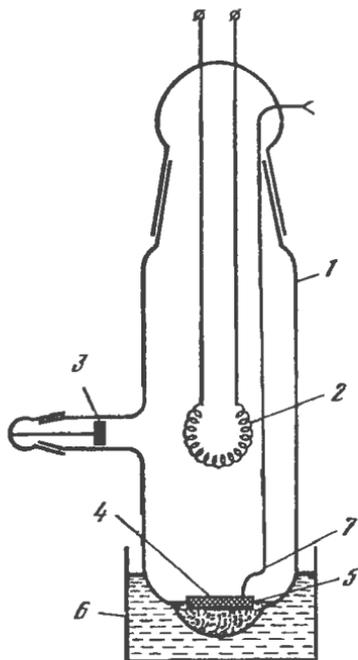
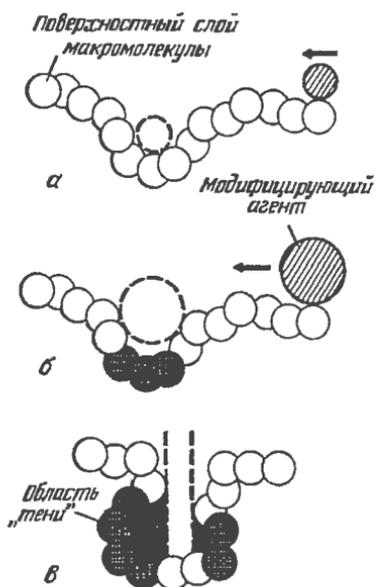


Рис. 2.8. Доступная поверхность, определенная по методу "скользящей пробы" для атома трития (а) и модифицирующих агентов большего размера, например воды (б)

В тени (в) участки доступной поверхности, не определяемые экспериментально

Рис. 2.9. Схема экспериментальной установки

1 – реактор; 2 – вольфрамовая нить; 3 – целлюлозный монитор; 4 – чашечка с образцом; 5 – сплав индий/галлий; 6 – термостат; 7 – термопара

цию температуры мишени в интервале 77–293 К. Температуру изменяли с использованием различных охлаждающих систем (схему экспериментальной установки см. на рис. 2.9). Оказалось, что при повышении температуры от 163 К до комнатной наблюдается увеличение включенной в белок метки, которое не может быть отнесено за счет обычного влияния температуры на скорость химической реакции (рис. 2.10). В самом деле, при температуре атомов трития 2000 К изменение температуры мишени от 77 до 293 К может дать увеличение включения метки в 1.2 раза; экспериментально же наблюдается почти трехкратный рост активности. Надо отметить, что по данным рэлеевского рассеяния мессбауэровского излучения и с использованием спиновых зондов в интервале 170–190 К происходит "размораживание" внутримолекулярной подвижности [28, 73]. Различен вид темпе-

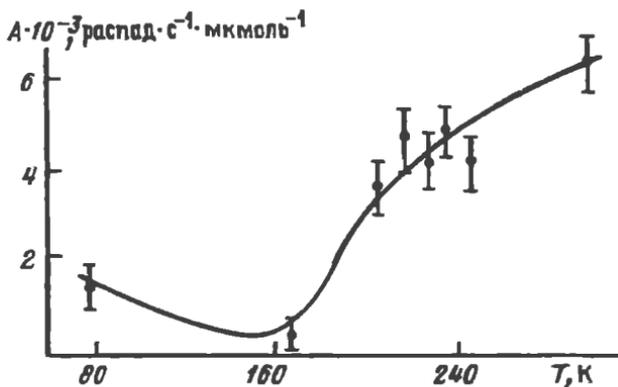


Рис. 2.10. Температурная зависимость включения метки в лизоцим

A – удельная радиоактивность белка, нормированная на активность монитора

ратурной зависимости доступности для остатков разных аминокислот. Часть остатков, доступность которых увеличивается с ростом температуры (H, K, R, L, P), находится преимущественно вне участков полипептидной цепи, для которых характерна повышенная подвижность. Это N- и C-концевые фрагменты вторичных структур, а также остатки вблизи точек поворота цепи. Остатки, расположенные в центральных областях α -спиралей практически не изменяют своей доступности в интервале температур 170–293 К (A, C, V, I, Y, F). Остатки аминокислот, расположенные в участках полипептидной цепи с повышенной подвижностью, слабо увеличивают свою доступность вплоть до комнатной температуры, однако при 293 К включение метки в них резко возрастает (S, T, G, D + N, E + Q). Неожиданным оказалось увеличение включения метки при температурах ниже 163 К. Сегодня единственным объяснением этого явления может служить изменение конформации белка в результате замораживания внутренней, прочно связанной с макромолекулой воды. Имеющиеся данные о свойствах воды в малых порах подтверждают это предположение.

Полученные в этом эксперименте усредненные величины включения метки не позволяют детально проанализировать влияние динамических параметров на доступную поверхность. Проведенное исследование следует рассматривать как первое экспериментальное доказательство существования такой связи и заявку на перспективность дальнейшего развития этого интересного направления.

Для получения картины доступности, отражающей реальные условия эксперимента, были разработаны специальные алгоритмы и компьютерные программы. Особенно важным наличие таких программ оказалось для работ по моделированию пространственных структур белков.

2.1.2. Моделирование введения трития в биологические макромолекулы

В работе Ивлева и соавт. [16] была предложена математическая модель, описывающая механизм введения тритиевой метки в макромолекулы в условиях бомбардировки. Неподвижно зафиксированная молекула подвергается бомбардировке изотропным пучком горячих атомов трития. При этом предполагалось, что любое прямое попадание в водородосодержащие группы первичного атома трития приводит к отрыву водорода и, в конечном счете, – к образованию меченого продукта, а все другие столкновения приводят к потере энергии и исключаются из дальнейшего рассмотрения. Для расчета площади доступной поверхности из центра тестируемого атома проводится N лучей-цилиндров с радиусом, равным радиусу атома трития. Затем для каждого цилиндра определяется расстояние от его боковой поверхности до ван-дер-ваальсовой поверхности других атомов. В случае пересечения этих поверхностей участок тестируемого атома считается недоступным для атаки атомами трития.

Площадь доступной поверхности (S) тестируемого атома для атомов трития равна

$$S = 4\pi(R_a + r_t) \cdot n / N,$$

где R_a , r_t – ван-дер-ваальсовы радиусы тестируемого атома и атома-пробы; N – общее число цилиндров, т.е. число направлений атаки; n – число траекторий атаки, приводящее к реакции.

Этот алгоритм был использован для моделирования бомбардировки белка – миоглобина кашалота – сферическими частицами с разными радиусами. Полученные расчеты площадей доступной поверхности сопоставляли с экспериментальным распределением метки в 20 N-концевых остатках белка. Оказалось, что наилучшее соответствие достигается при аппроксимации атома трития сферой с радиусом 1.1 Å. Отмечено, что расчет по модели бомбардировки лучше описывает эксперимент, чем алгоритмы, подобные предложенному Ли и Ричардсом.

Алгоритм, имитирующий введение тритиевой метки, был предложен в работе Богачевой и соавт. [7]. Он основан на методе Монте-Карло и построен на определении вероятности включения в макромолекулу горячих атомов трития при их движении по линейной траектории. Предполагается, что атом теряет свою реакционную способность при первом же столкновении. Суть алгоритма заключается в следующем. В объеме i -того остатка белка произвольным образом выбирается точка, через которую проводится прямая, имитирующая траекторию полета атома трития. Направление прямой – случайное. Определяются все атомы j данного остатка, центры которых находятся на расстоянии $d \geq r_{ij} + r_i$ от траектории полета атома трития. Из общего числа этих атомов выбирается первый в направлении движения атомов трития к остатку при условии, что он является первым и среди атомов всей макромолекулы. Вероятность включения трития подсчитывается для всех атомов углерода, имеющих связь с водородом (CH-, CH₂-, CH₃-группы). Процедура повторяется N_i раз, что соответствует бомбардировке изотропным потоком атомов трития. Количественной мерой доступности остатка j служит отношение числа атомов трития, достигших какого-либо атома i (n_i), к общему числу атомов трития (N_i), траектория которых проходит через объем данного остатка, $P_i = n_i/N_i$. В эксперименте величине P_i соответствует отношение числа атомов трития, включившихся в остаток i , к общему потоку атомов трития, бомбардирующих макромолекулу.

Получаемая по этому алгоритму вероятность введения метки явным образом не связана с площадью доступной поверхности, определяемой по модели скользящей пробы. Для перехода к традиционной размерности можно воспользоваться понятием сечения реакции, которое описано в главе I. В этой терминологии вероятность включения метки будет определяться как отношение сечения реакции, приводящей к включению метки в данную углеводородную группу, к полному сечению столкновения с этой же группой в условиях 100% доступности:

$$P_i = \sigma_{i,p}^a / \sigma_{i,0}^a + \sigma_{i,0}^s = \sigma_{i,p}^a / \pi(R_i + r_i)^2,$$

здесь $\sigma_{i,p}^a$ – сечение реакции для атомной группы i в составе белка, $\sigma_{i,0}^a$ и $\sigma_{i,0}^s$ – сечение реакции и рассеяния для той же группы в условиях 100%-ной доступности, R_i и r_i – ван-дер-ва-

альсовый радиус атомной группы и эффективный радиус атома трития $r_t = 1.1 \text{ \AA}$. И тогда

$$\sigma_{i,p}^a = P_i / \pi(R_i' + r_t)^2.$$

Общее сечение столкновения атома трития с атомной группой i , соответствующее стерической доступности, включает сечения реакции и рассеяния, т.е. столкновения, сопровождающегося потерей энергии, но не приводящего к химическому акту. Последняя величина не может быть определена в эксперименте, но для ее оценки можно воспользоваться модельными расчетами по методу траекторий. Согласно последним, сечение рассеяния составляет примерно 40 \AA^2 при сечении реакции $\sigma_a \sim 1 \text{ \AA}^2$. Отсюда полное сечение взаимодействия атома трития с группой i в белке приблизительно равно $40 \sigma_{i,p}^a$.

В большинстве случаев такие оценки не нужны, так как наибольший интерес представляет степень экранировки атома (или остатка) в третичной структуре белка по сравнению с полностью развернутой полипептидной цепью или с изолированными элементами вторичной структуры.

Алгоритм, имитирующий условия бомбардировки, позволяет моделировать эксперимент с такими изолированными фрагментами, сравнивать его результаты с реальным экспериментом и определять степень экранировки, обусловленную пространственной структурой. Основы такого подхода к моделированию третичной структуры белков рассмотрены ниже.

2.2. Пространственная структура белков и ее моделирование

Развитие методов рентгеноструктурного анализа и ЯМР привело к существенному расширению круга биологических объектов, пространственная структура которых определена с разрешением $1\text{--}5 \text{ \AA}$. В настоящее время установлена структура нескольких тысяч белков. Анализ структурных данных позволил установить ряд типичных структурных мотивов, некоторые общие закономерности, определяющие ход полипептидной цепи, и лег в основу целого ряда алгоритмов предсказания вторичной и пространственной структуры белков. Вместе с тем приходится констатировать, что все попытки теоретического предсказания трехмерной структуры даже на уровне хода полипептидной цепи не увенчались успехом.

Наиболее перспективными сегодня являются подходы, основанные на сочетании теоретических и экспериментальных методов. Удачным примером такого сочетания может служить система PROTEAN, разработанная для интерпретации данных ЯМР-спектроскопии и подробно описанная в обзоре [31]. Другим примером комбинированного подхода является серия работ, удачно объединивших теоретические, спектроскопические и генетические данные для описания структур ряда белков [44, 58].

Подробное описание и анализ экспериментальных и теоретических методов исследования пространственной структуры белков за последние десятилетия представлены в монографиях [22, 23]. Среди теоретических подходов к моделированию пространственной структуры белков можно выделить методы, основанные на предсказании возможных мест контакта между элементами вторичной структуры и построении на их основании трехмерных моделей структур белка [41, 54, 91, 96]. Недостатком этого подхода является неоднозначность предсказания остатков, входящих в зону контакта и многовариантность способов размещения элементов друг относительно друга, приводящая к большому числу альтернативных моделей пространственной структуры.

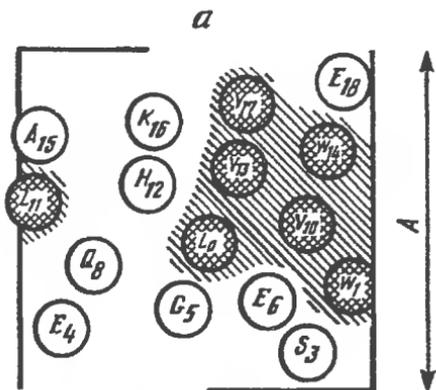
Потенциальная возможность определения с помощью метода тритиевой планиграфии областей контакта субъединиц в составе четвертичной структуры описана выше (см. 2.1). Аналогичный подход может быть применен и для определения контактов между элементами вторичной структуры в третичной структуре белка.

Хотя существование прямой связи между пространственной структурой макромолекулы и ее доступной поверхностью не вызывало сомнений, из-за ограниченности экспериментальных методов определения доступной поверхности до недавнего времени даже постановка задачи воссоздания трехмерной структуры по данным о доступности казалась невозможной. Использование метода тритиевой планиграфии позволило впервые сформулировать такую задачу и предложить алгоритмы для ее решения.

Возможность описания пространственной структуры макромолекул с помощью метода тритиевой планиграфии была впервые показана при анализе распределения метки по 20 аминокислотным остаткам N-концевой части миоглобина Гольданским и соавт. [15]. С N-конца полипептидной цепи последовательно отщепляли по методу Эдмана остатки аминокислот и определяли

Рис. 2.11. Развертка спирального участка *A* (остатки 3–18) миоглобина

Штриховой линией выделена область тени, в которой остатки стерически недоступны для атомов трития (*a*). Спираль *A* в составе молекулы миоглобина (*b*)



уровень включения трития в каждый из них. Было обнаружено закономерное чередование в последовательности спрятанных и доступных остатков: остатки с максимумом доступности находились в положениях $i \pm 3$, $i \pm 4$. По данным рентгеноструктурного анализа, доступные для трития аминокислотные остатки расположены на одной боковой поверхности α -спирали *A* миоглобина, образующей периферию глобулы, а малодоступные остатки находятся в областях контактов этой спирали с другими участками полипептидной цепи (рис. 2.11). Эта работа

явилась, по существу, первым указанием на то, что определяемая по включению метки стерическая доступность аминокислотных остатков связана с их расположением в третичной структуре и обусловила последующие попытки создания алгоритма, который бы позволил перейти от информации о доступности к трехмерной пространственной модели макромолекулы.

Очевидно, что если рассматривать полипептидную цепь как гибкую цепочку ковалентно связанных остатков, то попытки уложить ее в трехмерном пространстве с учетом профиля доступности едва ли могут привести к успеху из-за многовариантности способов упаковки элементов. Задача может быть существенно упрощена в случае введения в исходную цепь элементов вторичной структуры – α -спиралей и β -складок. Такие структурные элементы можно рассматривать как жесткие фрагменты, соединенные гибкими перетяжками и процесс моделирования сводится

к поиску такого размещения их в пространстве, при котором все доступные для трития остатки будут находиться на поверхности конструкции, а экранированные составят ее внутреннюю область.

В этом случае общий алгоритм построения модели может быть представлен следующим образом:

- 1) экспериментальное определение профиля доступности аминокислотных остатков белка по включению тритиевой метки;
- 2) предсказание элементов вторичной структуры белка с использованием теоретических подходов;
- 3) нахождение способа упаковки друг относительно друга элементов вторичной структуры, обеспечивающего поверхностную локализацию на модели доступных для атомов трития фрагментов цепи и, наоборот, нахождение недоступных участков внутри глобулы.

Развит целый ряд методов для предсказания вторичной структуры по известной аминокислотной последовательности, из них наибольшее распространение в настоящее время получили методы Чоу–Фасмана [40], Лима [77, 78] и Финкельштейна [88]. Эти методы обычно являются базовыми при предсказании вторичной структуры и дают достаточно высокую точность для локализации α -спиралей ($\geq 80\%$), хуже для β -структур и участков поворота ($\leq 60\%$).

Поиск нужного способа упаковки элементов вторичной структуры, учитывающего доступность аминокислотных остатков, представляет собой специальную задачу. Впервые такой подход был использован при построении модели пространственной структуры белка – парвальбумина щуки III, относящегося к семейству Ca^{2+} -связывающих белков, – Гедровичем и соавт. [48]. Это небольшой глобулярный белок, состоящий из 108 аминокислотных остатков. Данные рентгеноструктурного анализа для него отсутствуют, но есть данные для родственного белка – парвальбумина карпа [83]. При расчете вторичной структуры белка были использованы методы Чоу–Фасмана и Лима. Предсказанные шесть α -спиралей включали 69 аминокислот, что соответствовало 64% от всей суммы аминокислот. На рис. 2.12 представлено внутримолекулярное распределение тритиевой метки в белке. Выделены пептиды VI–V5, полученные после протеолиза протеазой V8, предсказанные α -спирали и два Ca^{2+} -связывающих центра. При построении модели трехмерной структуры белка α -спирали

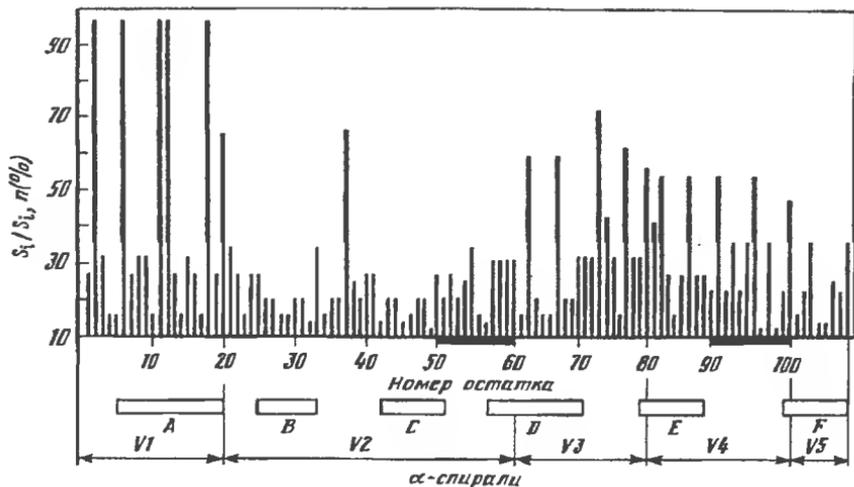


Рис. 2.12. Внутримолекулярное распределение тритиевой метки в парвальбумине щуки III

$(S_i/S_1, n)\%$ – отношение площадей доступной поверхности аминокислотного остатка (C—H-связи) в белке и пептиде Gly-X-Gly (модель 100%-ной доступности остатка); A–F – α -спиральные области; \leftarrow V1–V5 – пептиды, полученные после протеолиза белка протеазой V8; 50–60 и 90–100 – Ca^{2+} -связывающие участки

аппроксимировали жесткими цилиндрами, укладку проводили по принципу Птицына и Рашина, основанному на поиске контактов между соседними α -спиралями [87]. Наименее экспонированные гидрофобные элементы вторичной структуры считали гидрофобным ядром глобулы. Укладку полипептидной цепи проводили путем последовательного поиска контактов сначала между внутренними спиралями C и D, а затем последовательно присоединяли к образовавшемуся комплексу спирали E, F, B и A (см. рис. 2.13). При выборе относительной ориентации спиралей помогало знание участков связывания кальция. Полученная в результате трехмерная модель по своей архитектуре близка к известной структуре миогена карпа [72, 83] и хорошо описывает известные свойства белка, в частности высокую доступность остатков лизина, аспарагиновой и глутаминовой кислот. Интересно, что доступность остатков в составе двух петель DE и CD (места связывания ионов Ca^{2+}) отличается в два раза, что коррелирует с известной разницей в константах связывания катионов. Отмечены и различия в структурах парвальбумина щуки и карпа, из которых наиболее существенно отличие в расположении спирали D.

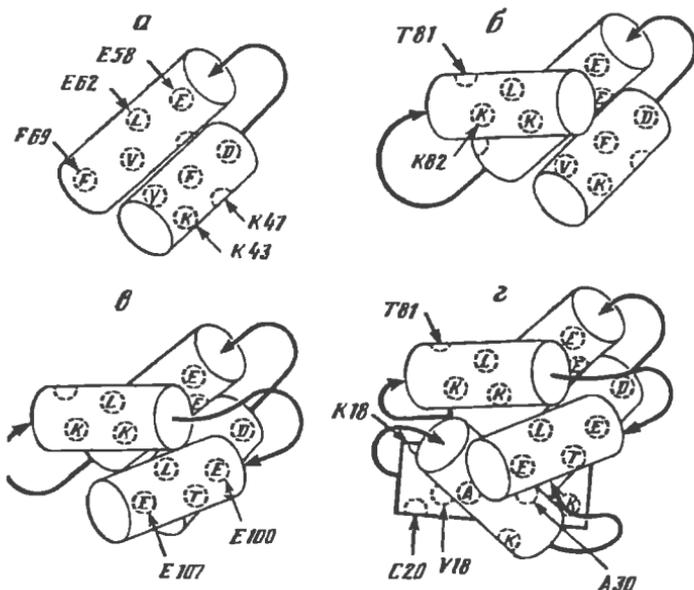


Рис. 2.13. Пошаговая укладка α -спиралей и схематическая модель парвальбумина щуки III

Комплексы спиралей: а – CD; б – CDE; в – CDEF; г – пространственная модель белка

Так как данные рентгеноструктурного анализа этого белка до настоящего времени отсутствуют, трудно определить, существуют ли эти отличия реально или связаны с погрешностями использованного алгоритма.

Для исключения вклада, вносимого экранировкой остатка за счет ближайшего окружения, надо сопоставить включение метки в данный элемент вторичной структуры в составе макромолекулы и в изолированном состоянии. Так как α -спирали и тем более β -складки, отдельно взятые, существовать не могут, но необходимая информация может быть получена в компьютерном эксперименте, алгоритм которого был описан выше.

Между тем, в общем случае вероятность включения метки в данный аминокислотный остаток (i) определяется его экранировкой ближайшими соседними по цепи остатками ($i + 1, i - 1$) и остатками, сближенными за счет образования вторичной структуры (в α -спирали – это остатки в положении $i \pm 1, i \pm 3$), а также экранировкой в составе третичной структуры за счет образования контактов между элементами вторичной структуры. Очевидно, что вклад последней наиболее существен при построении модели.

Определение его дает прямую информацию о местах контактов между элементами. Более того, форма области контакта уже служит указанием на тип взаимной ориентации элементов. Так, если на поверхности двух спиралей имеются протяженные области контакта (зона контакта составлена из остатков $i \pm 1$, $i \pm 3$, где i – центральный и наименее экспонированный остаток), то это указывает на параллельную (антипараллельную) ориентацию их осей. Контактные области, включающие остатки в положении $i \pm 1$, отвечают перпендикулярной ориентации. Наиболее известные промежуточные случаи включают области контактов спиралей, ориентированных под углом $60 \pm 30^\circ$ друг к другу, ближайшие соседи центрального остатка в этом случае – $i \pm 1$, $i \pm 3$, $i \pm 4$ (Козн и соавт. [41]).

При моделировании в компьютер вводили координаты атомов соответствующего элемента вторичной структуры, построенного по известным структурным параметрам: длинам связей, углам Φ , Ψ для конкретной последовательности аминокислот. Вероятность "включения метки" в изолированную структуру может быть затем сопоставлена с распределением тритиевой метки в целой макромолекуле в реальном эксперименте. Остатки, доступность которых наиболее существенно уменьшается при переходе от изолированных элементов вторичной структуры ко всей белковой молекуле, должны быть отнесены к области контакта. Зоной контакта считается совокупность нескольких таких остатков, сближенных на поверхности структурного элемента. Такой подход был использован в ряде работ [6–8, 35].

Существенным моментом построения трехмерной модели является выбор последовательности совмещения элементов друг с другом. Даже при условии, что контактируют между собой в первую очередь соседние по цепи элементы, выбор стартовой комбинации по существу является произвольным.

В случае четырех белков – миоглобина, λ -кро-репрессора, парвальбумина карпа и лизоцима – были опробованы разные варианты последовательности сборки [6–8, 35]. Для всех этих белков имеются данные рентгеноструктурного анализа, что делало их удобными модельными объектами для апробирования метода и уточнения его деталей. При поиске контактирующих партнеров учитывали длины "перетяжек" между элементами вторичной структуры и их стереохимию. В последнем случае использовали общие правила, сформулированные Ефимовым [46, 47].

2.2.1. Парвальбумин карпа

Все возможные варианты "укладки" элементов вторичной структуры были рассмотрены на примере парвальбумина карпа [7], содержащего шесть спиралей: *A, B, C, D, E, F*. Белок характеризуется относительно невысокой степенью спиральности (48%) и длинными перетяжками между спиральями (от 6 до 15 остатков). Сопоставление экспериментального профиля доступности и доступности изолированных спиралей, определенных по результатам компьютерного моделирования, позволило выделить потенциальные зоны контакта элементов вторичной структуры (рис. 2.14).

Считая наиболее вероятным образование контактов между соседними по цепи спиральями, авторы проанализировали более 30 комбинаций. Оказалось, что каждый вариант последовательности сборки приводит к разным моделям.

На рис. 2.15 в качестве примера приведены модели структур, получающихся при укладке элементов в последовательности от N- к С-концу полипептидной цепи (*a*), в "обратном" направлении –

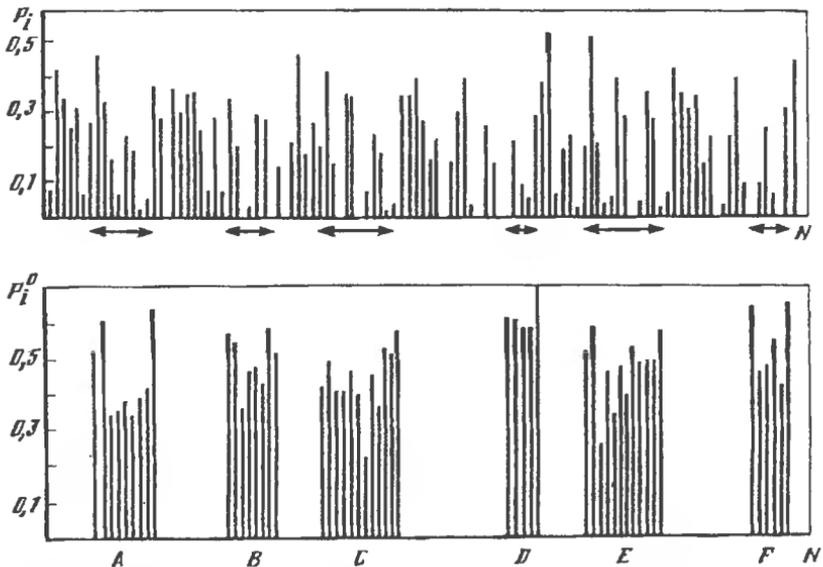


Рис. 2.14. "Профиль доступности" полипептидной цепи парвальбумина карпа (верхняя часть) и изолированных α -спиральных участков (нижняя часть)

N – номер остатка в последовательности. A, B, C, D, E, F – обозначения α -спиралей.
 P_i и P_i^0 – вероятности введения метки в остатки аминокислот в составе белка и изолированных спиралей соответственно

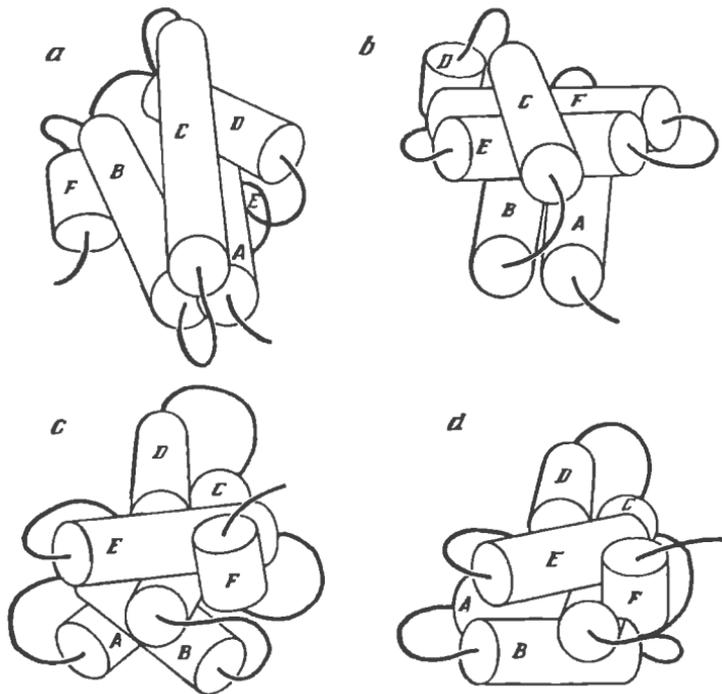


Рис. 2.15. Шестиспиральные комплексы – модели пространственной структуры парвальбумина карпа, получающиеся при разной последовательности "сборки" α -спиралей

a – последовательно в направлении от N- к C-концу: $A + B + C + D + E + F$; *b* – от C- к N-концу: $F + E + D + C + B + A$; *c* – от начального комплекса двух спиралей C и D, наиболее экранированных (наименее доступных) в составе макромолекулы: $(C + D) + E + F + B + A$; *d* – то же, что и в случае *c*, но с присоединением комплекса спиралей A и B как целого: $(C + D) + E + F + (A + B)$. С данными рентгеноструктурного анализа согласуется только модель *a*, полученная при сборке от N- к C-концу полипептидной цепи

от C- к N-концу (*b*) и от центра "нуклеации", образованного парой наиболее экранированных спиралей C и D (*c*, *d*). Из всех способов укладки к модели, совпадающей с рентгеноструктурными данными, приводит только последовательность укладки спиралей в направлении от N- к C-концу, т.е. в последовательности $A + B + C + D + E + F$, а также при сборке через стадии образования двухспиральных комплексов: $(A + B) + (C + D) + (E + F)$; $(A + B) + C + (D + E) + F$; $A + (B + C) + D + (E + F)$; $A + B + (C + D) + (E + F)$; $A + B + C + D + (E + F)$. Во всех случаях порядок сборки соответствует направлению от N- к C-концу полипептидной цепи.

В качестве примера на рис. 2.16 приведена последовательность сборки элементов вторичной структуры от N- к C-концу

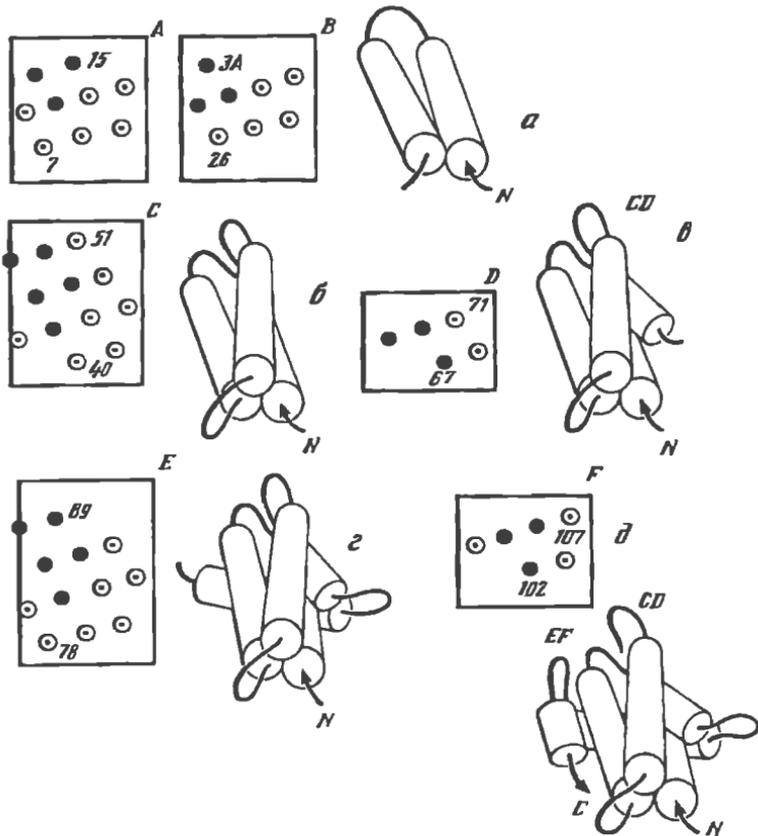


Рис. 2.16. Схема последовательной укладки α -спиралей в направлении от N-к C-концу в соответствии с наиболее вероятными зонами контакта, показанными на развертках поверхности спиралей

a – комплекс спиралей *AB* ($A + B$); *б* – присоединение спирали *C* ($AB + C$); *в* – присоединение спирали *D* ($ABC + D$); *г* – присоединение спирали *E* ($ABCD + E$); *д* – присоединение спирали *F* ($ABCDE + F$). Показано расположение в модели N- и C-концевых спиральных остатков и "петли" *CD* и *EF*, образующие центры связывания Ca^{2+}

полипептидной цепи. Полученная модель может быть сопоставлена с результатами рентгеноструктурного анализа. Как видно на рис. 2.17, в модели, как и в реальной структуре, спирали *A* и *B* антипараллельны и образуют один "слой" упаковки. "Выше" и "ниже" этого слоя расположены спирали *C* и *E*. Короткие спирали *D* и *F* как бы пересекают слой *A*–*B*. Совпадают и направления спиралей. Единственное отличие между этими моделями в расположении спирали *E*, которая, по данным рентгеноструктурного анализа, размещается в одном "слое" со спиралями

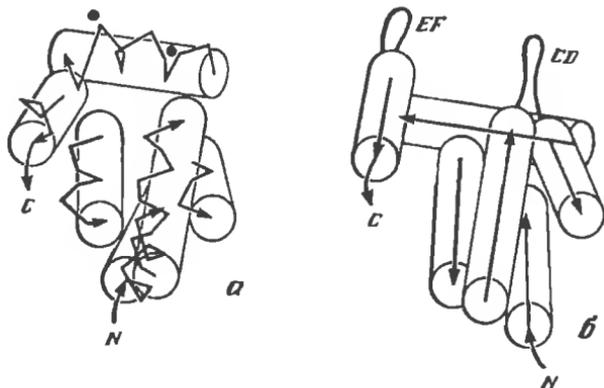


Рис. 2.17. Сравнение моделей пространственной структуры парвальбумина карпа, построенных по данным РСА (*а*) и путем последовательного присоединения α -спиралей в направлении $N \rightarrow C$ (*б*)

Приведены проекции спиральных элементов на плоскость $X-Y$ при одинаковой пространственной ориентации осей спиралей A и E , показан ход полипептидной цепи (C_{α} -атомов), стрелками даю направление от N - к C -концу, места связывания ионов Ca^{2+} (черные кружки)

A и B и контактирует только с N -концевой областью спирали B . Такого рода отличия могут быть обусловлены тем, что не учтена экранировка, вносимая неупорядоченными участками полипептидной цепи.

Характерной чертой структуры молекулы парвальбумина карпа является пространственная разнесенность Ca^{2+} -связывающих центров и N - и C -концов спиралей (остатки $N7$ и $K107$), лежащих на противоположных "сторонах" белковой глобулы. Это хорошо видно и на модели. Можно оценить расстояние между N - и C -концевыми остатками и Ca^{2+} -связывающими центрами. Расстояние между остатками $N7$ и $K107$ составляет приблизительно 20 \AA , между центрами связывания кальция $\sim 10 \text{ \AA}$, что хорошо совпадает с расчетом по атомным координатам (17.3 и 11.9 \AA). Этим характеристикам не соответствует ни одна из моделей, полученных при других последовательностях сборки.

2.2.2. Миоглобин кашалота

Сравнительно короткая полипептидная цепь, состоящая из 153 остатков аминокислот, высокое (77%) содержание α -спиральных участков и короткие перетяжки между ними, ограничивающие число их возможных относительных ориентаций, сделали

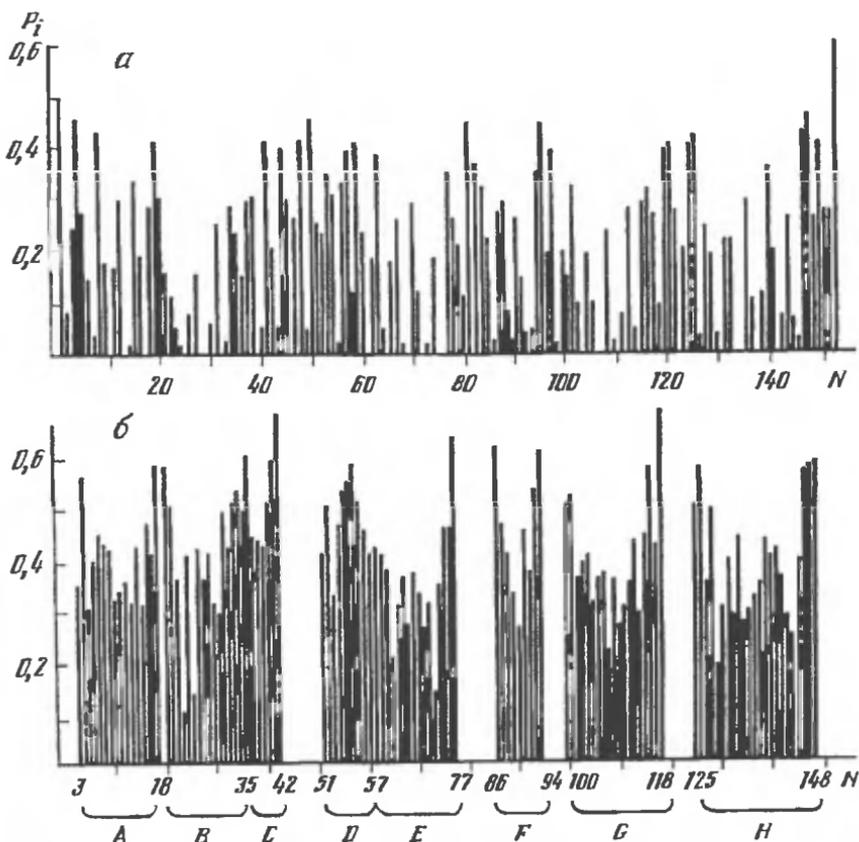


Рис. 2.18. Профиль доступности аминокислотных остатков в глобуле миоглобина (а) и в составе изолированных α -спиралей (б)

N – порядковый номер остатка, P_i – вероятность включения метки (доступность); А–Н – обозначение спиральных участков

миоглобин кашалота классическим объектом для проверки различных алгоритмов предсказания пространственной структуры. Описанный выше для парвальбумина карпа алгоритм построения модели трехмерной структуры, основанный на сравнении профилей доступности полипептидной цепи в целом белке и изолированных α -спиралах был использован и для миоглобина [6]. На рис. 2.18 приведены распределения вероятности включения метки в отдельные остатки аминокислот в белке (а) и отдельных спиралах А, В, С, D, E, F, G и H. Наиболее существенно уменьшается доступность остатков при "переносе" в белок спиралей В и F, которые должны входить в гидрофобное ядро глобулы. Если рассматривать, как предлагали Птицын и

Рашин [87], только контакты соседних по цепи спиралей, то сборку элементов в порядке уменьшения степени доступности следовало бы начинать с пары $F-G$. В обоих случаях получаемые в результате модели существенно отличались от истинной структуры, определенной рентгеноструктурным анализом.

Были рассмотрены и другие последовательности сборки. Оказалось, что корректная модель пространственной структуры получается только при сборке спиралей в последовательности от N- к C-концу полипептидной цепи, т.е. $A + B + C + D + E + F + G + H$. Последовательность получаемых при этом структур и конечный восмиспиральный комплекс $ABCDEFGH$ показаны на рис. 2.19. Здесь же для сравнения приведена модель, построенная по данным рентгеноструктурного анализа. Видно, что обе модели хорошо совпадают друг с другом.

Построение модели миоглобина подтвердило закономерность, отмеченную на примере парвальбумина карпа, а именно, соответствие модели структуре, определенной по данным рентгеноструктурного анализа, достигается при последовательном соединении соседних по цепи спиралей в направлении от N- к C-концу. Причем каждая последующая спираль присоединяется к образовавшемуся до этого момента комплексу как к единому целому. Контакты между соседними α -спиралями не могут образовываться в случае коротких перетяжек (петель) между ними. В миоглобине это – спирали A, B и C , разделенные между собой одним остатком. Аналогично не взаимодействуют спирали D и E . Определенные на их поверхности контактные зоны остаются "вакантными" и занимаются спиралями, достаточно удаленными по последовательности. На примере сборки модели миоглобина авторы [6] обнаружили интересную особенность, возможно, также имеющую общий характер. В процессе укладки элементов вторичной структуры при присоединении спирали F к пятиспиральному комплексу $ABCDE$ возникал ряд альтернативных вариантов. Перетяжка между спиралями E и F включает восемь остатков и ее "длина" достаточна для упаковки α -спирали F антипараллельно спирали E и параллельно спирали A , тем более что на их поверхности есть подходящие для такой ориентации вакантные зоны контакта. Такая ориентация отсутствует в структуре целой макромолекулы, в которой спирали F, B и C образуют так называемый карман, в котором располагается протетическая группа – группа гема. Соответствие модели с

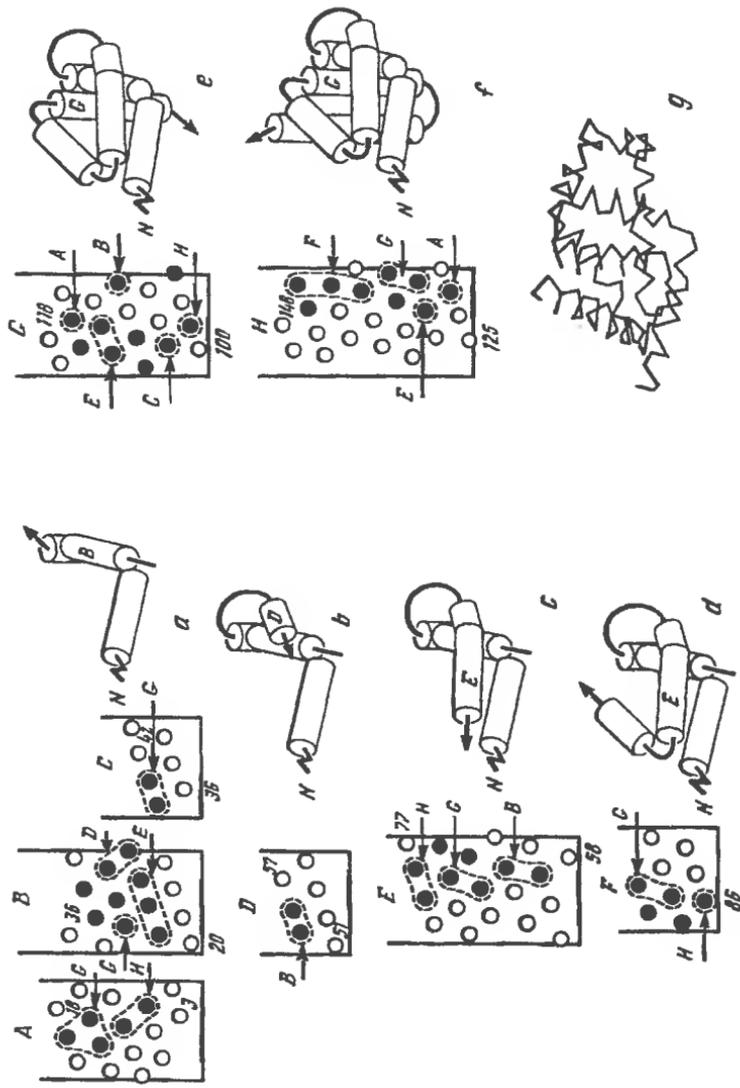


Рис. 2.19. Укладка спиралей миоглобина в направлении от N- к C-концу полипептидной цепи

Черными кружками на развертках спиралей показаны остатки, доступность которых при переносе изолированных спиральных элементов в глобулу падает больше чем на 80%. Пунктир и стрелки отмечают области контакта в конечной структуре. Для сравнения показана модель миоглобина, построенная по данным FSCA (g)

истинной структурой достигается, если рассматривать спираль *F* как единое целое с группой гема. В этом случае из-за стерических затруднений спираль *F* располагается под углом к спирали *E*, как показано на рис. 2.19, и эта структура сохраняется в модели до полного завершения сборки. Любопытно отметить, что при синтезе глобинов на рибосоме в естественных условиях встраивание гема в белок происходит контрансляционно, т.е. непосредственно в процессе биосинтеза еще до полного завершения трансляции [70, 71].

2.2.3. λ -кро-репрессор

Этот небольшой α -спиральный белок из 64 аминокислотных остатков включает пять α -спиралей *A*, *B*, *C*, *D* и *E*, соединенных как короткими (петли *AB*, *BC* и *DE* из одного, трех и двух остатков), так и длинной (петля *CD* из шести остатков) перетяжками. Общий ход работы с этим белком аналогичен использованному ранее для других белков [35]. Сопоставление экспериментального и рассчитанного для изолированных спиралей профилей доступности (рис. 2.20) позволило выявить потенциальные места контакта между элементами вторичной структуры. На этом же рисунке показаны развертки α -спиралей λ -кро-репрессора с выделением зон контактов. Выбор контактов между α -спиралями проводился с учетом длины перетяжек между ними, что существенно сужало круг поиска контактирующих спиралей. Единственная модель структуры, совпадающая с данными рентгеноструктурного анализа была получена при сборке α -спиралей в последовательности *A + B + C + D + E*, т.е. в направлении от N-к C-концу полипептидной цепи.

Спирали, отделенные одним-тремя остатками аминокислот, не могут контактировать друг с другом, и обнаруженные на их поверхностях зоны контактов обусловлены ассоциацией с другими более удаленными по цепи спиралями. Так, не контактируют друг с другом первые три N-концевые спирали в миоглобине (*A*, *B*, *C*), образующие конструкцию, схематически показанную на рис. 2.21, *a* и спирали *A*, *B*, *C* λ -кро-репрессора с перетяжками из одного и трех остатков соответственно (рис. 2.21, *в*). В миоглобине нет контакта и между спиралями *D* и *E* с перетяжкой *DE* из двух остатков. Первый контакт в этом белке становится возможным между спиралями *B* и *D*, причем форма контактной зоны диктует их относительное расположение под

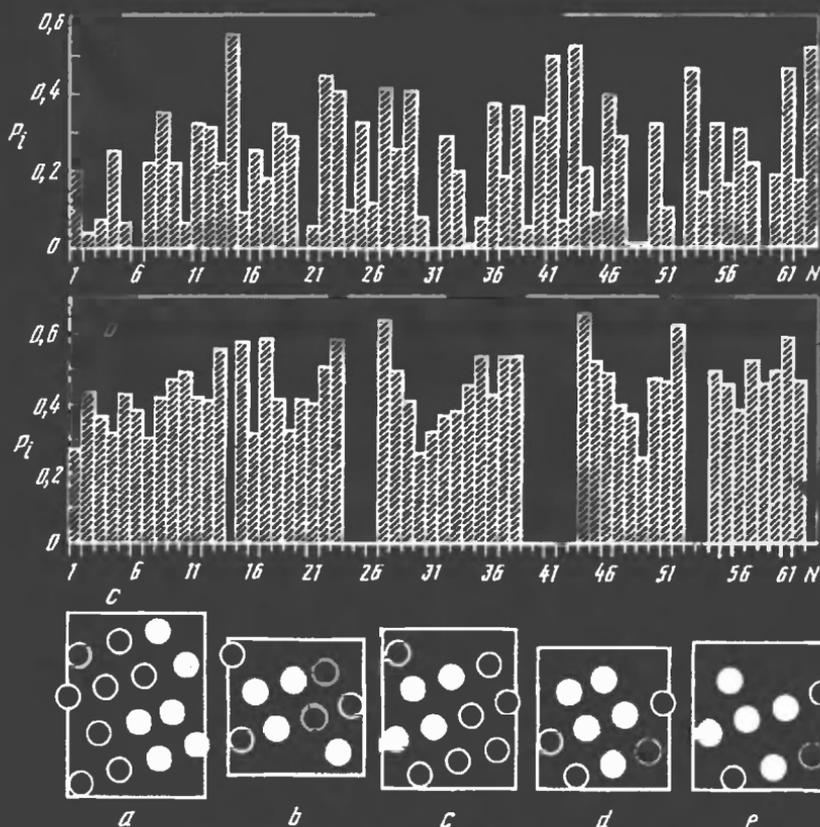


Рис. 2.20. Профиль доступности полипептидной цепи λ -кро-репрессора (а); профили и доступности полипептидной цепи для изолированных α -спиралей (компьютерная имитация эксперимента) (б); "развертки" поверхностей α -спиралей (с)

Черные кружки — остатки аминокислот, экранирующиеся при переносе изолированной α -спирали в макромолекулу. Совокупность таких остатков образует потенциальную зону контакта между спиральями

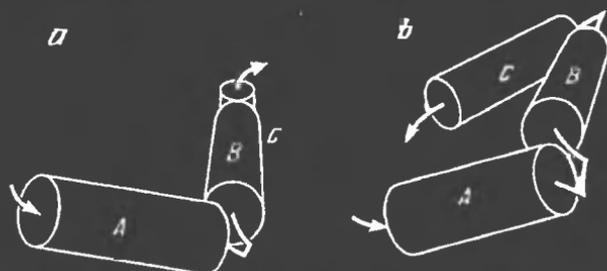


Рис. 2.21. Модель пространственной структуры комплекса непересекающихся α -спиралей, соединенных короткими (1–3 остатка) перетяжками. Миоглобин карман гема (а), λ -кро-репрессор (б)

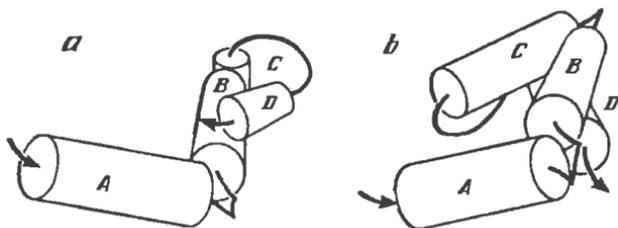


Рис. 2.22. Комплексы α -спиралей миоглобина (а), λ -кро-репрессора (б) с первыми межспиральными контактами

Контакт $B-D$ в миоглобине и $C-D, B-D$ в λ -кро-репрессоре

углом $\sim 90^\circ$ между осями (рис. 2.22, а). В λ -кро-репрессоре первые контакты образует спираль D с серединой спирали B и N-концевой частью спирали C (рис. 2.22, б).

2.2.4. Лизоцим

До сих пор рассматривались только α -спиральные белки. Это наиболее удобный объект для моделирования пространственной структуры, так как α -спирали можно аппроксимировать цилиндрами, на поверхности которых легко выделить области контактов. Образование этих областей нельзя целиком отнести только за счет ассоциации спираль—спираль, определенный вклад вносится и контактами с поверхностью спирали остатков из неупорядоченных областей. Важно также, что точность теоретических методов предсказания α -спиральных фрагментов выше, чем для других вторичных структур.

Существенно более сложным может оказаться воссоздание трехмерной структуры макромолекулы в случае белков, содержащих наряду с α -спиралями β -структуры, и полностью β -структурных белков. Первым и пока единственным опубликованным примером использования тритиевой планиграфии для моделирования пространственной структуры α/β -структурного белка является лизоцим куриного яйца [8]. Молекула этого белка, состоящая из 129 аминокислотных остатков, наряду с четырьмя α -спиралями содержит β -структуру, образованную тремя антипараллельными тяжами, составленными из остатков аминокислот 42–46 (β_1), 50–54 (β_2) и 57–60 (β_3). Перетяжки между элементами вторичной структуры достаточно длинные и возможны различные варианты их компоновки. Кроме того, третичная структура белка "сшита" четырьмя дисульфидными мостиками, включающими остатки цистеинов 6–127, 30–115, 64–80 и 76–94.

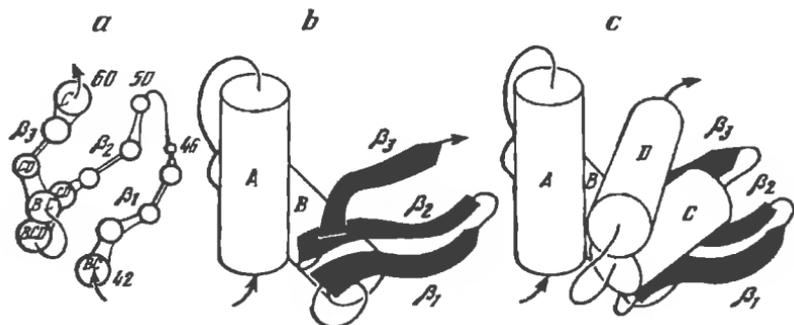


Рис. 2.23. Лизоцим куриного яйца

a – модель β -структуры, составленная из цепей 42–46 (β_1) 50–54 (β_2) и 57–60 (β_3); Буквы в кружках обозначают спирали, контактирующие отдельными остатками с β -цепями; *b* – модель комплекса спиралей *AB* с β -домеиом; *c* – модель пространственной структуры всего белка

Анализировали профиль доступности полипептидной цепи белка, полученный при бомбардировке целой макромолекулы и отдельных структурных элементов: α -спиралей *A*, *B*, *C*, *D*; β -структуры и отдельно β -цепей из трех указанных выше участков последовательности: β_1 , β_2 , β_3 и $\beta_1 + \beta_2 + \beta_3$.

На первой стадии моделирования строился комплекс из двух первых N-концевых спиралей *A* и *B*. Имеющиеся на их поверхности зоны контактов позволяли практически однозначно сформировать двухспиральный комплекс. Далее были рассмотрены различные варианты построения модели макромолекулы: 1 – последовательная сборка только α -спиралей; 2 – последовательное присоединение к двухспиральному комплексу *AB* цепей β_1 , β_2 и β_3 и 3 – формирование законченной β -структуры ($\beta_1 + \beta_2 + \beta_3$), которую затем как единое целое присоединяют к паре спиралей *AB*. Эти пути приводили к сильно отличающимся пространственным структурам, из которых данным рентгеноструктурного анализа соответствовала только модель, полученная при ассоциации β -цепей в законченную β -структуру и ее присоединении как целого к комплексу спиралей *AB*. По данным рентгеноструктурного анализа, ни одна из первых двух спиралей не контактирует с остатками, образующими тяж β_1 . Более того, спираль *A* вообще не имеет контактов с β -структурой, а спираль *C* контактирует с β_3 - и β_2 -тяжами. Спирали *C* и *D* присоединяли последовательно к комплексу спиралей *AB* β . Модель структуры β -домена, комплекса *AB* β и *AB* β *CD*, т.е. модель макромолекулы лизоцима, представлена на рис. 2.23.

При построении структуры лизоцима встал вопрос о моделировании сетки дисульфидных связей. Последние, как известно, играют важную роль в устойчивости структуры белков.

Дисульфидные связи. Важную роль в устойчивости структуры белка играют S-S-связи, образованные сильно разнесенными по полипептидной цепи цистеинами. При моделировании структуры лизоцима были обнаружены особенности, связанные с образованием ковалентных S-S-мостиков [35]. В молекуле лизоцима существуют четыре S-S-мостика, объединяющие остатки цистеина 6-127, 30-115, 64-80 и 76-94. Из восьми остатков цистеина четыре расположены в α -спиралях и по степени экранировки должны быть включены в контактные зоны. Высокая экранировка атомов серы обнаружена во всех цистеинах, и, по всей видимости, этим обусловлена устойчивость белка к восстанавливающим агентам. При последовательной укладке полипептидной цепи с N-конца первыми могут быть сближены остатки цистеинов в положениях 6, 30, 64, 76 и т.д., т.е. сближенные в первичной структуре. В этом случае дисульфидные связи должны образовываться в первую очередь между этими остатками, т.е. возникать мостики 6-30, 64-76, 80-94 и 115-127. Как видно, это противоречит реальной структуре. Остается предположить, что высокая экранировка цистеина в белке определяется не участием их в контакте элементов вторичной структуры, а особенностями стереометрии группы $\text{CH}-\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}$, в которой углеродные группы экранируют друг друга. В самом деле, в контактных зонах на поверхности спиралей *A*, *B*, *C* и *D* остатки цистеинов располагаются на их периферии и при условии максимального перекрытия контактных зон при сборке оказываются на противоположных сторонах спиралей вне области контакта. Такое положение сохраняется до тех пор, пока практически вся трехмерная структура не будет собрана и дисульфидные связи образуются между цистеиновыми остатками, сближенными в конечной модели.

Анализ результатов работ [6-8] позволил сформулировать правила, необходимые для получения корректных моделей пространственных структур белков [35].

1. "Укладка" элементов пространственной структуры должна проводиться в последовательности от N- к C-концу полипептидной цепи.

2. Кофакторы и другие группы, ковалентно связанные с остатками аминокислот, должны рассматриваться при моделировании как единое целое с соответствующим элементом вторичной структуры в случае, если эти связи образуются котрансляционно.

3. В α/β -белках, имеющих отдельно α -спиральный и β -структурный домен, β -структура моделируется как отдельный комплекс, который как единое целое взаимодействует с ранее образованной структурой.

4. Ковалентные S-S-мостики образуются на завершающей стадии моделирования, когда пространственная структура, составленная из α -спиралей и β -структур, уже полностью сформирована.

Отметим, что эти выводы являются предварительными и для их уточнения необходимо существенное расширение числа базовых белков, в первую очередь α/β -белков и белков, структура которых включает несколько доменов. Полностью остался не рассмотренным вопрос о моделировании структуры β -белков. Можно надеяться, что дальнейшее развитие исследований в этом направлении приведет к установлению ряда правил, используя которые с помощью данного алгоритма окажется возможным прогнозировать пространственные структуры белков.

Тот факт, что описанный алгоритм моделирования отражает последовательность синтеза полипептидной цепи на рибосоме, можно рассматривать как косвенное указание на то, что пространственная структура белка формируется непосредственно в процессе биосинтеза. Действительно, синтез белка из 150–300 аминокислотных остатков протекает за 30–60 с. Это время существенно меньше, чем необходимое для ренатурации белка (десятки минут и иногда часы), но существенно превышает характеристические времена, необходимые для формирования вторичных структур и внутримолекулярных движений. Если исходить из того, что образование пространственной структуры происходит после завершения трансляции, то необходимо допустить существование специальных факторов, которые в течение длительного времени препятствуют сворачиванию полипептидной цепи, а также защищают ее от воздействия различных протеолитических агентов. В работах Финкельштейна и соавт. [27] показана возможность "попадания" неупорядоченной белковой цепи из 100–150 аминокислотных остатков в самую

стабильную структуру за время порядка минуты $\sim \exp(N^{2/3})$, где N – число аминокислотных остатков. Если есть путь сворачивания, по ходу которого падение энтропии практически тут же компенсируется падением энергии, то он не перекрыт высоким свободно энергетическим барьером, и сворачивание идет быстро [27, 51, 87]. При последовательной укладке от какого-либо центра нуклеации и фиксации звеньев, принадлежащих α -спиралям, со скоростью около 1 нс [100] теоретические расчеты хорошо согласуются с экспериментально наблюдаемыми.

Порядок построения моделей пространственных структур хорошо согласуется и с опубликованными в последнее время работами, в которых прямым экспериментальным путем показано, что растущая на рибосоме полипептидная цепь имеет определенную пространственную структуру, подобную структуре нативной макромолекулы [38, 47, 50, 68–70, 80]. Более того, для такого белка, как люцифераза, показано, что ферментативная активность белка проявляется одновременно с окончанием биосинтеза и отделением белка от рибосомы или при увеличении С-конца полипептидной цепи на 26 аминокислотных остатков без отделения белка от рибосомы [80]. Результаты работ [6–8, 35] не только соответствуют этой концепции, но их и невозможно объяснить в рамках каких-либо иных представлений, например, рассматривая самоорганизацию полностью развернутой полипептидной цепи, как это делалось в экспериментах по ренатурации белков [32, 43].

ЛИТЕРАТУРА

1. Биратова Л.А., Гольданский В.И., Румянцев Ю.М., Унукович М.С., Шишков А.В. // Молекуляр. биология. 1982. Т. 16. С. 117–122.
2. Блажчук И.С., Гвоздев Р.И., Скрипкин А.Ю., Шишков А.В. Физико-химические свойства биополимеров в растворе. Пуццино: ЦНБИ, 1985. С. 153–154.
3. Бобкова К.Е., Гедрович А.В., Анкилова В.Н., Лаврик О.И., Баратова Л.А., Шишков А.В. // Биохимия. 1990. Т. 55. С. 1570–1577.
4. Богачева Е.Н., Жуков Н.Д., Шишков А.В. // Молекуляр. биология. 1993. Т. 27. С. 1044–1050.
5. Богачева Е.Н., Шишков А.А., Шишков А.В., Баратова Л.А. // Там же. 1994. Т. 28. С. 1035–1043.
6. Богачева Е.Н., Мороз А.П., Шишков А.В., Баратова Л.А. // Там же. 1996. Т. 30. С. 637–643.
7. Богачева Е.Н., Мороз А.П., Шишков А.В., Баратова Л.А. // Там же. С. 885–892.

8. Богачева Е.Н., Мороз А.П., Шишков А.В., Баратова Л.А. // Там же. 1997. Т. 31. С. 500–505.
9. Волынская А.В., Скрипкин А.Ю., Шишков А.В., Джафаров Э.С., Румянцев Ю.М., Гольданский В.И. // Там же. 1985. Т. 19. С. 1294–1300.
10. Гвоздев Р.И., Шишков А.В., Скрипкин А.Ю., Блажчук И.С. // XVI конф. ФЕБО. М., 1984. С. 142.
11. Гедрович А.В., Волынская А.В., Скрипкин А.Ю., Шишков А.В., Баратова Л.А., Гольданский В.И. // Там же. С. 334.
12. Гедрович А.В., Бадун Г.А. // Молекуляр. биология. 1992. Т. 26. С. 558–564.
13. Гедрович А.В., Баратова Л.А., Богачева Е.Н., Медведкин В.Н., Шишков А.В. // Там же. 1993. Т. 27. С. 309–315.
14. Гедрович А.В., Гольданский В.И., Румянцев Ю.М., Унукович М.С., Шишков А.В. // Радиохимия. 1984. Т. 26. С. 483–494.
15. Гольданский В.И., Румянцев Ю.М., Шишков А.В., Баратова Л.А., Белянова Л.П. // Молекуляр. биология. 1982. Т. 16. С. 528–534.
16. Ивлев А.Б., Гедрович А.В., Шишков А.В. // Там же. 1992. Т. 26. С. 1047–1053.
17. Котлова Н.Г., Кулиш М.А., Миронов А.Ф. // Биоорганич. химия. 1988. Т. 14. С. 1695–1696.
18. Крашенинников И.А., Комар А.А., Аджубей И.А. // Биохимия. 1989. Т. 54. С. 187–200.
19. Крашенинников И.А., Комар А.А., Аджубей И.А. // Докл. АН СССР. 1989. Т. 305. С. 1006–1012.
20. Нейман Л.А., Смоляков В.С., Шишков А.В. Общие проблемы физико-химической биологии. М.: ВИНТИ, 1985. Т. 2.
21. Павлов М.Ю., Федоров Б.А. // Биофизика. 1982. Т. 27. Р. 609–613.
22. Попов Е.М. // Проблема белка / Ред. В.Г. Иванов. М.: Наука, 1996. Т. 2. С. 229–337.
23. Попов Е.М. Проблема белка / Ред. В.Г. Иванов. М.: Наука, 1997. Т. 3. 604 с.
24. Скрипкин А.Ю., Волынский А.В., Шишков А.В., Гольданский В.И. // Молекуляр. биология. 1981. Т. 15. С. 1364–1367.
25. Ульмасов Х.А., Нестерова М.В., Полетаев А.И., Северин Е.С. // Биохимия. 1981. Т. 46. С. 1294–1300.
26. Филатов И.А., Кулиш М.А., Миронов А.Ф., Ножевникова Е.В., Нейман Л.А. // Биоорганич. химия. 1987. Т. 13. С. 623–627.
27. Финкельштейн А.В., Бадретдинов А.Я. // Молекуляр. биология. 1997. Т. 31. С. 469–479.
28. Фролов Е.Н., Белоногова О.В., Лихтенштейн Г.И. // Равновесная динамика нативной структуры белка. Пушчино: НЦБИ, 1977. С. 99–142.
29. Шишков А.В. // Хим. физика. 1991. Т. 10. С. 878–900.
30. Шишков А.В., Баратова Л.А. // Успехи химии. 1994. Т. 63. С. 825–841.
31. Altman R.S., Jardetzky O. // J. Biochem. 1986. Vol. 100. P. 1403–1423.
32. Anfinsen C.B., Sheraga H.A. // Adv. Protein Chem. 1975. Vol. 29. P. 205–300.
33. Bernstein F.S., Koetzle T.F., Williams J.B. et al. // J. Mol. Biol. 1977. Vol. 112. P. 535–542.

34. Bobkova E.V., Gedrovich A.V., Ankilova V.N., Lavrik O.I., Baratova L.A., Shishkov A.V. // *Biochem. Intern.* 1990. Vol. 20. P. 1001–1009.
35. Bogacheva E.N., Goldanskii V.I., Shishkov A.V., Galkin A.V., Baratova L.A. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1998. Vol. 95. P. 2790–2794.
36. Bondi A. // *J. Phys. Chem.* 1964. Vol. 68. P. 441–456.
37. Chavez L.G., Scheraga H.A. // *Biochemistry.* 1980. Vol. 19. P. 1005–1012.
38. Chen W., Helenius J., Braakman I., Helenius A. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1995. Vol. 92. P. 6229–6233.
39. Choi K.M., Brimacombe R. // *Nucl. Acids Res.* 1998. Vol. 26. P. 887–895.
40. Chou P.V., Fasman G.D. // *Annu. Rev. Biochem.* 1978. Vol. 47. P. 251–276.
41. Cohen F.E., Richmond T.J., Richards F.M. // *J. Mol. Biol.* 1979. Vol. 132. P. 275–288.
42. Connolly M.J. // *Science.* 1983. Vol. 221. P. 709–713.
43. Creighton T.E. // *Adv. Biophys.* 1984. Vol. 18. P. 1–20.
44. Curtis B.M., Presnell S.R., Srinivasan S., Sassenfeld H., Klinke R., Jeffery E., Cosman D., March C.J., Cohen F.E. // *Proteins.* 1991. Vol. 11. P. 111–119.
45. Efimov A.V. // *J. Mol. Biol.* 1979. Vol. 134. P. 23–40.
46. Efimov A.V. // *Progr. Biophys. and Mol. Biol.* 1993. Vol. 60. P. 201–203.
47. Fedorov A.N., Baldwin T.O. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1995. Vol. 92. P. 1227–1231.
48. Gedrovich A., Shishkov A.V., Goldanskii V., Baratova L., Grebenshchikov N., Efimov A. // *Europ. Biophys. J.* 1991. Vol. 19. P. 283–286.
49. Gelles J., Klapper M.N. // *Biochim. et biophys. acta.* 1978. Vol. 53. P. 465–477.
50. Gilmore R., Coffey M.C., Leone G., McLure K., Lee P.W.K. // *EMBO J.* 1996. Vol. 15. P. 2651–2658.
51. Go N. // *Annu. Rev. Biophys. and Bioeng.* 1983. Vol. 12. P. 183–210.
52. Goldanskii V.I., Kashirin I.A., Shishkov A.V., Baratova L.A., Grebenshchikov N.I. // *J. Mol. Biol.* 1988. Vol. 201. P. 567–574.
53. Grandjean J., Laszlo P., Gerday C. // *FEBS Lett.* 1977. Vol. 81. P. 376–380.
54. Harris N.L., Presnell S.R., Cohen F.E. // *J. Mol. Biol.* 1994. Vol. 236. P. 1356–1368.
55. Holden H.M., Ito M., Hartshorne D.J., Rayment I. // *Ibid.* 1992. Vol. 227. P. 840–851.
56. Houghten R.A., Li C.H. // *Meth. Enzymol.* 1983. Vol. 91, pt. 1. P. 549–559.
57. Hughson F.M., Barrick D., Baldwin R.L. // *Biochemistry.* 1991. Vol. 30. P. 4113–4118.
58. Huang Z., Prusiner S.B., Cohen F.E. // *Folding and Design.* 1995. Vol. 1. P. 13–19.
59. Imman J.K., Perham R.N., Dubois G.C., Pella E. // *Meth. Enzymol.* 1983. Vol. 91, pt 1. P 559–570.
60. Islam S.A., Weaver D.L. // *Proteins: Structure, Function, Genetics.* 1990. Vol. 8. P. 1–5.
61. Islam S.A., Weaver D.L. // *Ibid.* 1991. Vol. 10. P. 300–314.

62. *Jentoft N., Dearborn D.G.* // *Meth. Enzymol.* 1983. Vol. 91, pt 1. P. 570–580.
63. *Ji T.H.* // *Ibid.* P. 580–612.
64. *Jonafh A., Sielecki A., Moul J., Podjarky A., Traub W.* // *Biochemistry.* 1977. Vol. 16. P. 1413–1417.
65. *Kadenbach B., Stroh A.* // *FEBS Lett.* 1984. Vol. 173. P. 374–380.
66. *Karplus M., Weaver D.L.* // *Nature.* 1976. Vol. 260. P. 404–406.
67. *Kim P.S., Baldwin R.L.* // *Biochemistry.* 1980. Vol. 19. P. 6124–6129.
68. *Kolb V.A., Makeev E.V., Spirin A.S.* // *EMBO J.* 1994. Vol. 13. P. 3631–3637.
69. *Komar A.A., Kommer A., Krasheninnikov I.A., Spirin A.S.* // *FEBS Lett.* 1993. Vol. 326. P. 261–263.
70. *Komar A.A., Kommer A., Krasheninnikov I.A., Spirin A.S.* // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272. P. 10646–10651.
71. *Krasheninnikov I.A., Komar A.A., Adzhubei I.A.* // *Protein Chem.* 1991. Vol. 10. P. 445–454.
72. *Kreitsinger R.H., Nockolds C.E.* // *J. Biol. Chem.* 1973. Vol. 248. P. 3313–3326.
73. *Kurinov I.V., Krupyanskii Yu.F., Suzdalev I.P., Goldanskii V.I.* // *Hyperfine Interact.* 1987. Vol. 33. P. 223–232.
74. *Lee B., Richards F.M.* // *J. Mol. Biol.* 1971. Vol. 55. P. 379–400.
75. *Levitt M., Chotia C.* // *Nature.* 1976. Vol. 261. P. 552–558.
76. *Levitt M.* // *J. Mol. Biol.* 1983. Vol. 168. P. 595–657.
77. *Lim V.I.* // *Ibid.* 1974. Vol. 88. P. 872–894.
78. *Lim V.I., Spirin A.S.* // *Ibid.* 1986. Vol. 188. P. 565–577.
79. *Liu Z.J., Zhou J.M.* // *Biochim. et biophys. acta.* 1995. Vol. 1253. P. 63–68.
80. *Makeev E.V., Kolb V.A., Spirin A.S.* // *FEBS Lett.* 1996. Vol. 378. P. 166–170.
81. *Miller S., Janin J., Lesk A.M., Chotia C.* // *Nature.* 1987. Vol. 328. P. 834–836.
82. *Miller S., Janin J., Lesk M., Chotia C.* // *J. Mol. Biol.* 1987. Vol. 196. P. 641–656.
83. *Moews P.C., Kreitsinger R.H.* // *Ibid.* 1975. Vol. 91. P. 229–237.
84. *Mosyak L., Reshetnikova L., Goldgur Y., Delarue M.* // *Nat. Struct. Biol.* 1995. Vol. 2. P. 537–545.
85. *Novotny J., Handschumacher M., Haber E.* et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1986. Vol. 83. P. 226–230.
86. *Ptitsyn O.B., Rashin A.A.* // *Biophys. Chem.* 1975. Vol. 3. P. 1–20.
87. *Ptitsyn O.B., Finkelstein A.V.* // *Quart. Rev. Biophys.* 1980. Vol. 13. P. 339–386.
88. *Ptitsyn O.B., Finkelstein A.V.* // *Biopolymers.* 1983. Vol. 22. P. 15–25.
89. *Richards F.M.* // *Annu. Rev. Biophys. and Bioeng.* 1977. Vol. 6. P. 151–176.
90. *Richmond T.J.* // *J. Mol. Biol.* 1984. Vol. 178. P. 63–89.
91. *Richmond T.J., Richards F.M.* // *Ibid.* 1978. Vol. 119. P. 537–555.
92. *Ryabova L.A., Desplancq D., Spirin A.S., Pluckthun A.* // *Nat. Biotechnol.* 1997. Vol. 15. P. 79–84.
93. *Shrake A., Rupley J.A.* // *J. Mol. Biol.* 1973. Vol. 79. P. 351–371.

94. *Tarr G.E.* // *Methods of protein microcharacterization* / Ed. J. Shively. Clifton (N.J.): Humana press, 1986. P. 155–194.
95. *Volynskaya A.V., Kasumov E.A., Bogacheva E.N., Shishkov A.V., Goldanskii V.I.* // *Europ. J. Biophys.* 1994. Vol. 23. P. 139–143.
96. *Walther D., Eisenhaber F.S., Argos P.* // *J. Mol. Biol.* 1996. Vol. 225. P. 536–553.
97. *Wodak S.J., Janin J.* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1980. Vol. 77. P. 1736–1744.
98. *Woody B.R., Kright C.A.* // *Virology.* 1959. Vol. 9. P. 359–374.
99. *Zhou H.M., Zhang X.H., Yong Y., Tsou C.L.* // *Biochem. J.* 1993. Vol. 291. 103–107.
100. *Zana R.* // *Biopolymers.* 1975. Vol. 14. P. 2425–2428.

КОНФОРМАЦИОННЫЕ ПЕРЕХОДЫ В ГЛОБУЛЯРНЫХ БЕЛКАХ

Конформация белка претерпевает изменения как в результате каких-либо "внешних воздействий", так и в процессах функционирования. Без знания того, что происходит при этом со структурой макромолекулы невозможно понять детали механизма. Кроме того, исследование конформационных изменений, в частности в процессах разворачивания полипептидной цепи и обратного ее сворачивания, позволяет выявить основные физические и химические факторы, определяющие пространственную структуру белка и ее стабильность. Как уже упоминалось выше, трудно надеяться на то, что в такого рода работах удастся использовать метод рентгеноструктурного анализа. Безусловно, перспективным в обозримом будущем представляется метод ЯМР, но сегодня реально приходится ограничиваться набором физических и физико-химических методов, которые либо дают общие характеристики состояния макромолекулы (калориметрия, КД-спектроскопия), либо изменения в локальном участке, окружающем репортерную группу. К таким методам относятся спиновые и флуоресцентные зонды, а также методы, основанные на химической модификации определенных функциональных групп. В первом случае нельзя рассчитывать на высокую чувствительность, и конформационные переходы, сопровождающиеся относительно малыми изменениями структуры, остаются незамеченными. Во втором, очевидно, регистрируются только те переходы, которые затрагивают структуру непосредственного окружения зонда или модифицируемой функциональной группы.

Из общих соображений ясно, что даже незначительные по масштабам изменения структуры – смещения остатков аминокислот или сегментов полипептидной цепи – должны сопровождаться существенными изменениями доступной поверхности.

Например, в результате сравнительно небольших смещений (1–3 Å) остатки, полностью экранированные в одном состоянии, могут оказаться на поверхности глобулы в другом.

Высокая чувствительность, возможность следить, в принципе, за каждым аминокислотным остатком в цепи и, главное, возможность работы с белковыми растворами позволяет фиксировать структуру на любом этапе воздействия. Это привело к появлению целой серии работ, в которых исследовали конформационные переходы в ряде глобулярных белков под действием различных денатурирующих агентов.

История изучения процессов денатурации белков насчитывает не один десяток лет. Интерес к этой области обусловлен многими причинами. Далекое не последнее место среди них занимает надежда связать механизм разворачивания полипептидной цепи с природой процессов, приводящих к формированию уникальной пространственной структуры. Переход белка из нативной конформации в развернутую неструктурированную форму и обратный переход флуктуирующей полипептидной цепи в исходную компактную структуру есть не что иное, как непосредственный процесс разрушения и формирования именно тех взаимодействий, которые и обуславливают структурную организацию белковой молекулы. При этом проявляется прямая связь между химическим и пространственным строением белка.

С этим связано и особое внимание, уделяемое вопросу существования и структуры промежуточных состояний, через которые может проходить белок в процессе перехода глобула–клубок. Современные методы изучения кинетики быстрых реакций показали существование на ранних стадиях сворачивания белков интермедиатов [12]. В условиях равновесия, особенно при исследовании оптическими и калориметрическими методами, для небольших однодоменных белков переход сворачивание–разворачивание в подавляющем числе случаев выглядит как одностадийный процесс, происходящий по механизму перехода между двумя состояниями. Однако ряд методов, характеризующих изменение отдельных частей глобулы (ЯМР высокого разрешения [9], неспецифическое мечение поверхности [18], иммунохимический метод [10], водородный обмен [15]), показывает, что и в равновесных условиях сворачивание–разворачивание белка не может быть одностадийным процессом и протекает через образование одного или нескольких промежуточных состояний.

В этом случае процесс денатурации, или обратный ему процесс ренатурации, может быть представлен схемой:



где N, N' и D – нативная, промежуточная и полностью развернутая (неупорядоченный статистический клубок) формы.

Вопрос об универсальности этого механизма до настоящего времени остается дискуссионным.

Существование таких промежуточных состояний для некоторых белков достаточно надежно показано экспериментально. Одно из этих состояний, получившее название "расплавленная глобула" [16, 24, 26], можно охарактеризовать менее плотной по сравнению с нативной макромолекулой упаковкой элементов вторичной структуры при практически полном сохранении остальных параметров. Допуская возможность существования устойчивых интермедиатов для белков, состоящих из нескольких доменов, Привалов отрицает аналогичный механизм в случае однодоменных белков [23].

В пользу того, что промежуточные состояния встречаются в процессах денатурации значительно чаще, чем это удастся фиксировать с помощью традиционных экспериментальных методов, говорят многочисленные наблюдения ингибирования ферментативной активности под действием тех или иных агентов в области концентраций, при которых на опыте не регистрируется изменение пространственной структуры.

Можно предположить, и к такому выводу приходит Цоу в своем обзоре [7], что в этом случае имеет место конформационный переход, затрагивающий часть структуры белка, образующую активный центр фермента. Согласно работе [7], активные центры ферментов являются более лабильными и соответственно более подвержены действию возмущающих агентов, чем остальная часть макромолекулы. Требование лабильности активного центра продиктовано необходимостью строгой подстройки при связывании субстрата и на последующих стадиях каталитического цикла.

В работах [1–6, 14, 28] методом тритиевой планиграфии исследовалось влияние на доступную поверхность, а следовательно, и на пространственную структуру белка, типичных денатурантов: мочевины, гуанидинхлорида, солей металлов в широком диапазоне концентраций.

В качестве объектов исследования были выбраны относительно небольшие глобулярные белки: рибонуклеаза А, лизоцим куриного яйца и сывороточный альбумин человека. Выводы о конформации белка и ее изменениях делались на основании доступности для включения метки остатков аминокислот. К сожалению, при этом использованы средние величины удельной активности аминокислотных остатков данного типа, получаемые при помощи стандартной техники аминокислотного анализа кислотных гидролизатов белка. Но даже и при таком "грубом" подходе оказалось возможным зафиксировать такие изменения структуры, которые не обнаруживались обычными методами. Эксперимент проводили следующим образом. Водный раствор белка с заданной концентрацией добавки денатуранта инкубировали в течение длительного времени для установления равновесия, после чего быстро замораживали жидким азотом. При таких условиях фиксировались конформация макромолекулы, соответствующая данному денатурационному воздействию, и анализ распределения метки давал характеристику пространственной структуры этого состояния. Достоинством обсуждаемых работ является их комплексность, так как параллельно исследовалось влияние денатурантов на внутримолекулярную динамику и функциональные свойства (ферментативную активность) белков. Параллельно использовали методы, позволяющие получить характеристики внутримолекулярной динамики: изотопный обмен и рэлеевское рассеяние мессбауэровского излучения, а также тесты на сохранение биологических функций (ферментативной активности) для рибонуклеазы и лизоцима, и способность к связыванию лигандов для альбумина.

3.1. Рибонуклеаза А

Панкреатическая рибонуклеаза является классическим объектом, на котором проведено множество работ по исследованию денатурации и ренатурации. До сих пор господствующей точкой зрения было представление о разворачивании рибонуклеазы как одностадийном переходе между двумя состояниями. На это указывали результаты, полученные с помощью спектральных, флуоресцентных и хроматографических методов [21, 25]. Данные тритиевой планиграфии показали, что процесс денатурации значительно сложнее. На рис. 3.1 приведена зависимость площади доступной поверхности белковой глобулы S от концентрации моче-

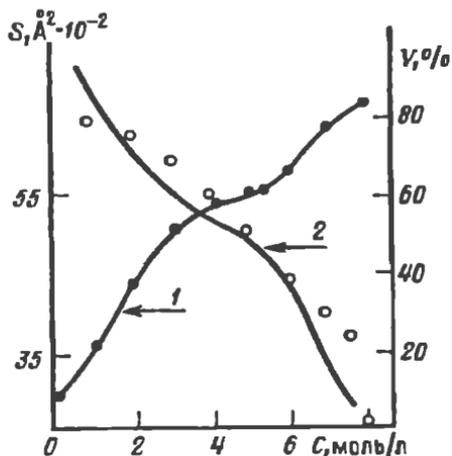


Рис. 3.1. Рибонуклеаза А

1 – зависимость площади доступной поверхности глобулы S от концентрации мочевины C ; 2 – зависимость ферментативной активности V ; линия – расчет, точки – эксперимент

вины. Видно, что функция $S = f(C)$ имеет два участка, один из которых ограничен интервалом концентраций 0–5 М, а второй 5–8 М, что свидетельствует о наличии двух типов конформационных переходов. Доступные площади аминокислотных

остатков увеличиваются с ростом концентрации мочевины, причем для некоторых остатков достигается максимальное значение доступной площади при концентрациях, намного меньших средней точки денатурации ($C_{1/2} > 6$ М): для Pro и Arg при 2М, Ser – 3М, Ala и Leu – 4М.

Авторы попытались оценить термодинамические параметры переходов, предположив, что каждый из них осуществляется по механизму перехода между двумя состояниями. Такой прием, хотя и не вполне правомерен, но часто используется для термодинамического анализа [8, 22, 27]. Полученные термодинамические параметры позволили количественно сопоставить результаты тритиевой планиграфии и оптических методов. Для первого перехода $\Delta G = 1.5$ ккал/моль и 8.4 ккал/моль для второго могут быть сопоставлены с результатами других исследований (см. табл. 3.1). Основные параметры переходов: ΔG^{H_2O} – изменение свободной энергии денатурации, $C_{1/2}$ – средняя концентрация перехода и $m = \delta \Delta G_{app} / \delta C$ и $\Delta \alpha$ – изменение экспонированности поверхности глобулы.

Приведенные в табл. 3.1. данные свидетельствуют о том, что переход рибонуклеазы в денатурированное состояние является двухстадийным процессом, причем параметры второго перехода хорошо совпадают с полученными по изменению оптических характеристик: $\Delta G - 8.4$ и 8.5 ккал/моль соответственно. Первый переход характеризуется меньшим энергетическим барьером. Анализ распределения метки по остаткам показал, что переход в

Таблица 3.1

Термодинамические параметры конформационных переходов рибонуклеазы А в растворах мочевины

Параметр	Первый переход	Второй переход	По литературным данным [21]
ΔG_{app} , ккал/моль (линейная экстраполяция)	1.5	8.4	8.5
$C_{1/2}$, моль	1.8	6.6	6.8
$\delta\Delta G_{\text{app}}/\delta C$	0.8	1.3	1.3
$\Delta\alpha$	0.17	0.07	0.34
ΔG_{app} (по методу Тэнфорда)	1.6	8.2	12.1

промежуточное состояние сопровождается увеличением доступности как гидрофильных, так и гидрофобных остатков, однако эти изменения неодинаковы для разных аминокислот. Аналогичную картину наблюдали и при переходе из промежуточного в развернутое состояние. Это свидетельствует о том, что денатурация рибонуклеазы происходит по механизму постепенного расширения (набухания) белковой глобулы. Значительная часть гидрофобного ядра (~36%) остается недоступной даже в 8М мочевины. Заметим, что подобные результаты были получены Мэтьюсоном и Шерагой при исследовании тепловой денатурации рибонуклеазы [18].

В общих чертах схоже с мочевиной и действие другого денатуранта – гуанидинхлорида (рис. 3.2). Однако в случае малых (до 0.4 М) концентраций вместо ожидаемого расширения глобулы обнаружено уменьшение площади доступной поверхности, т.е. сжатие, или увеличение компактности упаковки глобулы. О том, что подобного рода эффект в белках возможен, говорят и данные других исследований. Так, Майер и Шмидт [19] отмечали, что при низких (до 0.3 М) концентрациях гуанидинхлорида увеличивается устойчивость рибонуклеазы T_1 к действию мочевины и нагреву. Кривые с минимумом при концентрации гуанидинхлорида 0.2–0.3 М наблюдали Хагихара и соавт. [11] при измерении эллиптичности оптического вращения при 222 нм ацетилированного цитохрома С.

Уменьшение объема глобулы на 4–6%, сопровождающееся потерей ферментативной активности, было обнаружено при исследовании влияния гидратации на упаковку лизоцима [13].

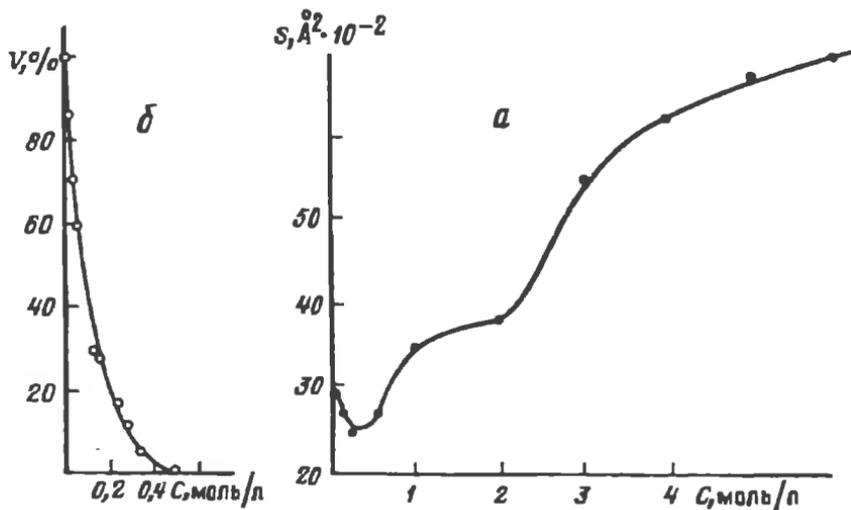


Рис. 3.2. Рибонуклеаза А

Зависимость площади доступной поверхности глобулины $S(a)$ и ферментативной активности (b) от концентрации гуанидидгидрохлорида. На кривой (b) линия—расчет, точки—эксперимент

Последующее увеличение концентрации гуанидингидрохлорида приводило к расширению глобулы, которое, как и в случае мочевины, проходило через стадию образования промежуточного состояния. Интересно отметить, что при концентрации денатуранта 0.6 M площадь доступной поверхности была равна по величине площади нативной глобулы, однако ее аминокислотный состав существенно отличался.

Предполагается, аналогично тому, как это было сделано при рассмотрении действия мочевины, что каждый переход представляет собой переход между двумя состояниями. Авторы получили термодинамические параметры, представленные в табл. 3.2. Как видно первый переход из нативного в промежуточное состояние характеризуется более высоким, чем в мочеvine, энергетическим барьером — 3.5 ккал/моль. Второе существенное отличие от мочевины — симбатность изменения доступности различных аминокислотных остатков. Это указывает на то, что механизм перехода $N \rightarrow N'$ аналогичен фазовому переходу I рода.

Особенности поведения гуанидингидрохлорида, в первую очередь эффект сжатия, могут быть объяснены ионной природой этого денатуранта. В самом деле, аналогичные по своему харак-

Таблица 3.2

Термодинамические параметры конформационных переходов рибонуклеазы А в растворах гуанидингидрохлорида

Параметр	Первый переход	Второй переход	По литературным данным [21]
ΔG_{app} , ккал/моль (линейная экстраполяция)	3.5	8.4	8.5
$C_{1/2}$, моль	0.7	2.5	2.9
$\delta\Delta G_{app}/\delta C$	5	3.1	2.9
$\Delta\alpha$	0.01	0.23	0.35
ΔG (по методу Тэнфорда)	–	8.4	14.8

теру зависимости были получены для добавок хлористого лития. И здесь в области малых концентраций соли обнаружено уменьшение площади доступной поверхности глобулы, близкое по величине к наблюдаемому в присутствии гуанидингидрохлорида.

Как уже упоминалось выше, отличительной чертой рассматриваемых работ является параллельно проведенное исследование влияние денатурантов на ферментативную активность и внутримолекулярную динамику белка. Среди многочисленных работ по денатурации белков лишь в немногих уделялось внимание сопоставлению конформации и ферментативной активности в ходе разворачивания фермента. Миллер и Болен [20] показали, что при концентрации гуанидинхлорида 1.25 М происходит инактивация рибонуклеазы А из поджелудочной железы при отсутствии заметных изменений структуры белковой молекулы. Аналогичные результаты были получены Яно и Ири для АТФазы [29]. Напрашивается вывод, что при малых концентрациях возмущающей добавки конформационные перестройки затрагивают активный центр фермента, оставляя без изменений оставшуюся часть структуры макромолекулы. Изменение активного центра с потерей ферментативной активности было зарегистрировано прямыми методами с использованием флуоресцентных [30] и спиновых меток [17]. Из раздела 3.2.3 видно, что уже малые изменения структуры (доступной поверхности) приводят к существенному изменению скорости ферментативной реакции, причем экспериментальные значения хорошо ложатся на кривую, построенную на основании расчета популяций нативного промежуточного и развернутого состояний. Добавки гуанидинхлорида также ингибируют фермент, однако полное подавление

активности наблюдается при еще меньших концентрациях денатуранта и совпадает с максимумом компактизации глобулы. Аналогично влияют и добавки соли лития. Примечательно, что последующее расширение глобулы не приводит к восстановлению ферментативной активности, что подтверждает отличие этого состояния от исходного нативного, фиксируемого по распределению метки.

Наблюдаемые структурные изменения, как расширение, так и сжатие белковой глобулы, должны сопровождаться соответствующими изменениями внутримолекулярной динамики. Измерения скорости изотопного обмена Н – Т показали, что сжатие молекулы приводит к уменьшению константы скорости этого процесса почти на 60%. При всех концентрациях мочевины и концентрациях гуанидингидрохлорида и хлористого лития, соответствующих расширению глобулы, наблюдали увеличение скорости обмена. Можно предположить, что сильное ингибирование ферментативной активности при сжатии глобулы в значительной степени связано с подавлением внутримолекулярной подвижности, которая играет в осуществлении функционально важных процессов не меньшую роль, чем статическая пространственная структура.

3.2. Лизоцим

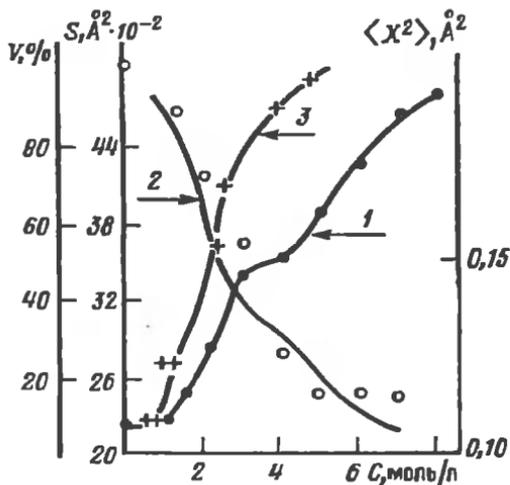
Аналогичный комплекс исследований был проведен с лизоцимом куриного яйца [1, 2, 6, 28]. От рибонуклеазы этот белок отличается более высокой стабильностью глобулы, "сшитой" четырьмя дисульфидными мостиками. Так, даже в 8М мочеvine не обнаружено изменений вязкости и оптических свойств раствора. Денатурация белка в мочеvine происходила лишь в сильно кислой среде ($\text{pH} \approx 2$).

По доступности для включения тритиевой метки обнаружены заметные изменения структуры лизоцима уже при малых концентрациях мочевины.

Как и в случае рибонуклеазы, переход в развернутое состояние проходил в две стадии (рис. 3.3). Анализ распределения метки по остаткам аминокислот показал, что оба перехода $\text{N} \rightarrow \text{N}'$ и $\text{N}' \rightarrow \text{D}$ протекают по механизму набухания глобулы, однако промежуточное состояние было термодинамически более устойчивым, чем в рибонуклеазе ($\Delta G \approx 2.6$ ккал/моль), и приводило к более компактной структуре глобулы.

Рис. 3.3. Лизоцим

Зависимость площади доступной поверхности глобулы S (1) и ферментативной активности V (2) и среднеквадратичной амплитуды смещения атомов $\langle X^2 \rangle$ (3) от концентрации мочевины. На кривой 2 линия—расчет, точки—эксперимент



Как и в рибонуклеазе, в полностью развернутом состоянии (8М мочевины) ядро глобулы оставалось недоступным. Денатурация лизоцима сопровождалась увеличением объема глобулы примерно на 55%. Это также отличало лизоцим от рибонуклеазы, разворачивание которой приводит почти к двукратному увеличению объема.

Репером ферментативной активности лизоцима служило измерение скорости лизиса клеточных стенок бактерии *Micococcus lyzodeicticus*. Как и в рибонуклеазе, расширение глобулы фермента сопровождалось ингибированием активности, которая хорошо описывалась в рамках схемы разворачивания через стадию образования промежуточного состояния. Уменьшение компактности упаковки полипептидной цепи приводило к увеличению внутримолекулярной подвижности.

Репером ферментативной активности лизоцима служило измерение скорости лизиса клеточных стенок бактерии *Micococcus lyzodeicticus*. Как и в рибонуклеазе, расширение глобулы фермента сопровождалось ингибированием активности, которая хорошо описывалась в рамках схемы разворачивания через стадию образования промежуточного состояния. Уменьшение компактности упаковки полипептидной цепи приводило к увеличению внутримолекулярной подвижности.

На рис. 3.3 приведены значения среднеквадратичной амплитуды смещения атомов $\langle X^2 \rangle$, полученные на основании данных рэлеевского рассеяния мессбауэровского излучения при разных концентрациях мочевины. Видно, что переход глобулы в развернутое состояние сопровождался практически двукратным увеличением $\langle X^2 \rangle$.

Похоже на наблюдаемое в рибонуклеазе влияние на лизоцим и добавок солей — LiCl и NaCl. В области низких концентраций происходил переход в сжатое состояние, причем максимальная степень компактизации структуры достигалась при меньших концентрациях NaCl, чем LiCl. В обоих случаях переход сопровождался резким уменьшением ферментативной активности. Через минимум проходит и зависимость величины $\langle X^2 \rangle$, причем минимумы подвижности и площади доступной поверхности обна-

ружены при одинаковых концентрациях солей. Как и в рибонуклеазе, последующее расширение глобулы до величины, равной площади глобулы в нативном состоянии, не приводило к восстановлению структуры или ферментативной активности.

3.3. Сывороточный альбумин человека

Структура этого белка существенно менее изучена, чем двух рассмотренных выше объектов. Известно, что альбумин представляет собой трехдоменный белок с относительно гибкими связями между доменами. Процесс разворачивания альбумина очень походил на наблюдаемый в лизоциме и рибонуклеазе, он также протекал через стадию образования промежуточной формы [1, 4, 5]. В отличие от лизоцима переход в промежуточное состояние $N \rightarrow N'$ не может быть описан как фазовый переход первого рода и, по всей видимости, включает два независимых процесса: смещение доменов относительно друг друга и их "набухание". Развернутое состояние альбумина при концентрации мочевины 8M менее компактно, чем в лизоциме.

Исследованы доступные поверхности молекулы сывороточного альбумина человека в N- (pH 6.7), F- (pH 3.5) и B-формах (pH 8.5), это позволило получить информацию о N-F- и N-B-переходах, происходящих в кислой и щелочной областях pH [5]. Показано, что F-форма по сравнению с N-формой характеризуется более высокой доступностью остатков Ser, Ala, Ile, Tyr, Phe, His, Arg, Pro, Val, а в B-форме хорошо доступными оказываются остатки Tyr, Ser, Arg, Gly Ile, Phe, Pro. Полные доступные поверхности молекулы белка при N-F- и N-B-переходах увеличиваются соответственно от 39000 до 70400 Å². На основании анализа доступности гидрофобных остатков предполагается, что расширение молекулы связано с разобцением в пространстве составляющих молекулу субъединиц.

Добавки хлорида лития при низких концентрациях и в этом белке приводили к сжатию глобулы, хотя минимум площади доступной поверхности приходился на область более высоких концентраций соли.

Функции альбумина связаны с переносом низкомолекулярных лигандов. Процесс образования комплекса белок-лиганд существенно менее специфичен, чем образование фермент-субстратного комплекса, но также напрямую связан с пространственной структурой белка, в первую очередь с наличием на его поверх-

ности гидрофобных полостей определенного размера. Способность альбумина к связыванию гидрофобного красителя – метилоранжа – использована в качестве аналога ферментативной активности для того, чтобы проследить влияние изменений структуры на функциональные свойства белка. Как оказалось, переход глобулы в состояние с более высокой степенью компактности, чем в нативной структуре, приводит к резкому уменьшению сродства к лиганду, которое, однако, восстанавливается при последующем расширении. Это отличает альбумин от рассмотренных выше ферментов и может быть объяснено неспецифическим характером процесса связывания.

Таким образом, высокая чувствительность метода тритиевой планиграфии позволила зафиксировать, самые тонкие изменения конформации белка, в том числе такие, масштабы которых нельзя обнаружить другими методами. Отдельного рассмотрения заслуживает образование состояний с повышенной степенью компактности. Показано, что сжатие обусловлено, в основном, уплотнением периферического слоя глобулы и сопровождается подавлением внутримолекулярной подвижности. Установлено, что действие денатурантов ионной природы нельзя свести только к изменению суммарного заряда глобулы. Так, известно, что влияние солей на электростатические взаимодействия не зависит от вида иона, а определяется только ионной силой раствора. В нашем случае минимум площади доступной поверхности, а следовательно, максимум степени сжатия для разных денатурантов, приходился на разные значения концентрации, причем последняя во всех случаях превышает необходимую для нейтрализации зарядов (0.15–0.20 М). Компактизацию глобулы вызывали и добавки таких веществ, как сахароза и полиэтиленгликоль, молекулы которых не имеют заряженных групп.

В настоящее время эффект сжатия объяснен конкуренцией между белковой макромолекулой и добавкой в процессе гидратации. Известно, что анионы предпочтительнее гидратируются в водном растворе, что уменьшает степень гидратации белка. Предпочтительна также гидратация молекул сахарозы и полиэтиленгликоля. Уменьшение объема белковой макромолекулы было обнаружено и при дегидратации кристаллических белков авторами работы [13]. Показано, что катионы металлов и мочевины предпочтительно связываются с белками и этот процесс приводит к разрыхлению структуры, наблюдаемому при

повышении концентрации добавок. По эффективности разрыхляющего действия исследованные нами катионы располагаются в ряд: $\text{Na}^+ < \text{Li}^+ < \text{гуанидин}^+$.

Таким образом, компактизацию белковой глобулы нельзя рассматривать как переход в промежуточное состояние в процессе денатурации, она сопряжена с влиянием степени гидратации на структуру и внутримолекулярную динамику.

Последнее было исследовано различными методами, в том числе мессбауэровской спектроскопией, и было показано, что уменьшение гидратации влечет за собой понижение внутримолекулярной подвижности.

Итогом серии работ, выполненных с привлечением метода тритиевой планиграфии [1–6, 14, 28], является то, что для ряда белков (рибонуклеаза А, лизоцим, сывороточный альбумин) показано наличие интермедиатов при изучении денатурации под воздействием агентов различной природы (мочевина, гуанидингидрохлорид). Это свидетельствует о том, что даже в случае небольших по размерам белков переход между нативным и развернутым состоянием не является одностадийным процессом и не протекает по механизму "все или ничего". Во всех случаях путь разворачивания проходит через стадию интермедиатов с промежуточной между нативно и развернутой степенью компактности, зависящей от вида денатуранта. Наиболее компактным является интермедиат рибонуклеазы в гуанидингидрохлориде – увеличение объема глобулы составляет 18%. Для лизоцима и сывороточного альбумина в мочеvine этот объем интермедиата на 26% больше объема нативной глобулы, для рибонуклеазы эта величина составляет 60%. По степени компактности и увеличению сольватации аминокислотных остатков первых три интермедиата можно отнести к состоянию "влажной" расплавленной глобуле, а последний – к набухшей. Оба состояния теоретически предсказаны Шахновичем и Финкельштейном [26]. Обнаружены детальные различия в образовании интермедиатов: степень кооперативности перехода, последовательность экспонирования элементов пространственной структуры растворителю (внешняя оболочка, междоменные области, гидрофобное ядро), степень сохранения уникальной пространственной структуры, контролируемая измерением ферментативной активности. Интермедиат рибонуклеазы в гуанидингидрохлориде не проявляет ферментативной активности, в мочеvine сохраняет примерно

50% активности, а лизоцим в мочевице обладает 25%-ной активностью. Во всех случаях имеются принципиально важные черты, позволяющие судить о характере интермедиатов и источниках их стабильности: возможность проникновения молекул воды во внутренний объем глобулы, сохранение большей части нативного гидрофобного ядра (80%) и вторичной структуры.

Исследование влияния солей для этих белков показало, что LiCl, NaCl и гуанидингидрохлорид приводят к небольшому уменьшению глобулы (в среднем на 5%). Столь малое изменение объема глобулы до сих пор не было обнаружено ни одним из существующих методов. В семи системах выявлен эффект сжатия глобулы, он был подтвержден также симбатным уменьшением внутримолекулярной подвижности (третий-водородный обмен и рэлеевское рассеяние мессбауэровского излучения) и полным ингибированием ферментативной активности и связывающей способности гидрофобного красителя метилоранжа с сывороточным альбумином.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вольнская А.В., Скрипкин А.Ю., Шишков А.В., Джафаров Э.С., Румянцев Ю.М., Гольданский В.И. // Молекуляр. биология. 1985. Т. 19. С. 1294–1300.
2. Вольнская А.В., Мурашева С.А., Скрипкин А.Ю., Шишков А.В., Гольданский В.И. // Там же. 1989. Т. 23. С. 356–363.
3. Вольнская А.В., Касумов Э.А., Шишков А.В. // Там же. 1998. Т. 32. С. 472–481.
4. Джафаров Э.С., Алиев Л.А., Скрипкин А.Ю., Вольнская А.В., Шишков А.В., Баратова Л.А., Гольданский В.И. // Изв. АН АзССР. 1985. Т. 3. С. 102–110.
5. Джафаров Э.С. // Молекуляр. биология. 1991. Т. 25. С. 1412–1416.
6. Скрипкин А.Ю., Вольнская А.В., Шишков А.В., Гольданский В.И. // Там же. 1989. Т. 23. С. 365–371.
7. Цоу Ч.-Л. // Биохимия. 1998. Т. 63, вып. 3. С. 300–307.
8. Ayvad F., Yaday S., Taneja S. // Biochem. J. 1992. Vol. 287. P. 481–485.
9. Benz F.M., Roberts G.C.K. // J. Mol. Biol. 1975. Vol. 91. P. 367–387.
10. Chavez L.G., Scheraga H.A. // Biochemistry. 1980. Vol. 19. P. 1005–1012.
11. Hagihara Y., Tan Y., Goto Y. // J. Mol. Biol. 1994. Vol. 237. P. 336–348.
12. Jaenicke R., Bucher J. // Chemattract-Biochem. and Mol. Biol. 1993. Vol. 4. P. 1–30.
13. Kachalova G.S., Morozov V.N., Morozova T.Ya., Myachin E.T., Vagin A.A., Strokopytov B.V., Nekrasov Yu.V. // FEBS Lett. 1991. Vol. 28. P. 91–94.
14. Kasumov E.A., Volynskaya A.V., Shishkov A.V., Goldanskii V.I. // Stud. Biophys. 1990. Vol. 136. P. 167–170.

15. *Kim P.S., Baldwin R.L.* // *Biochemistry*. 1980. Vol. 19. P. 6124–6129.
16. *Kuwajima K.* // *Proteins: Structure, Function and Genetics*. 1989. Vol. 6. P. 87–103.
17. *Liu Z.J., Zhou J.M.* // *Biochim et biophys. acta*. 1995. Vol. 1253. P. 63–68.
18. *Matheson R.R., Scheraga H.A.* // *Biochemistry*. 1976. Vol. 18. P. 2437–2445.
19. *Mayr L.M., Schmid F.X.* // *Ibid.* 1993. Vol. 32. P. 7994–7998.
20. *Miller J.F., Bolen D.W.* // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1978. Vol. 81. P. 610–615.
21. *Pace C.N.* // *CRC Crit. Rev. Biochem.* 1975. Vol. 3. P. 1–43.
22. *Pace C.N.* // *Meth. Enzymol.* 1986. Vol. 131. P. 266–280.
23. *Privalov P.L.* // *J. Mol. Biol.* 1996. Vol. 258. P. 707–725.
24. *Ptitsyn O.B.* // *J. Protein. Chem.* 1987. Vol. 6. P. 273–293.
25. *Saio J., Wada A.* // *Biopolymers*. 1983. Vol. 22. P. 2105–2132.
26. *Shakhnovich E.I., Finkelstein A.V.* // *Ibid.* 1989. Vol. 28. P. 1681–1694.
27. *Tarford C.* // *Adv. Protein Chem.* 1968. Vol. 23. P. 121–282.
28. *Volynskaya A.V., Kasumov E.A., Bogacheva E.N., Shishkov A.V., Guldanskii V.I.* // *Europ. J. Biophys.* 1994. Vol. 23. P. 139–143.
29. *Yano Y., Irie M.* // *J. Biochem.* 1975. Vol. 78. P. 1001–1011.
30. *Zhou H.M., Zhang X.H., Yong Y., Tsou C.L.* // *Biochem. J.* 1993. Vol. 291. P. 103–107.

ТРИТИЕВАЯ ПЛАНИГРАФИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПЛЕКСОВ

В последнее время в биоорганической химии и молекулярной биологии центр исследований структуры отдельных молекул биополимеров *in vitro* сместился в сторону изучения структуры и взаимодействия комплексов биомолекул *in vivo*. Развитие исследований в этом направлении призвано приблизить понимание сложных молекулярных механизмов взаимодействия молекул в живой клетке и возможности управления этими взаимодействиями.

Вследствие сложности биологических макромолекулярных ансамблей до настоящего времени нет, к сожалению, адекватного метода установления их пространственной организации. Основным недостатком современной методологии, связанной с использованием традиционных подходов и заключающейся в определении доступности тех или иных функциональных групп или связей макромолекулы действию специфических агентов, является отрывочность получающейся информации, позволяющей охарактеризовать лишь локальные фрагменты объекта, ничего не говоря о структуре объекта в целом.

Метод электронной микроскопии, который, при современном уровне обработки данных позволяет достичь разрешения порядка 20 Å, дает возможность изучать общую архитектуру комплексов, распределение масс компонентов в них, относительную локализацию молекул, изучать четвертичную структуру белков (например, работы [47, 92]). Более того, разработка криоэлектронной микроскопии обусловила возможность изучения архитектуры интактных биологических образцов. Однако образцы, получаемые с ее помощью, не дают тонких деталей архитектуры макромолекулы и не достигают нужного разрешения структуры сложных макромолекулярных ансамблей [42]. Более того, для неокрашенных биологических образцов и образцов в некристаллическом состоянии увеличение разрешения их электронных микроснимков

принципиально ограничивается опасностью их значительного радиационного разрушения.

Метод сканирующей туннельной микроскопии, позволяющий в ряде случаев достичь рекордной разрешающей способности при исследовании поверхностей объектов, сегодня, однако, еще трудно представить в качестве ординарного инструмента исследования. Возможность его применения к биологическим объектам носит в основном иллюстративный характер [20]. И только рентгеноструктурный анализ (РСА) и, отчасти, ядерный магнитный резонанс (ЯМР) высокого разрешения дают исчерпывающие данные о пространственной структуре объекта. Однако трудоемкость и ряд принципиальных ограничений значительно затрудняют применение этих методов для изучения пространственной структуры многокомпонентных макромолекулярных ансамблей. При этом, наряду с чисто техническими проблемами, связанными с выращиванием высокоупорядоченных кристаллов, необходимыми для РСА, существуют определенные трудности с интерпретацией сложных дифракционных картин.

В этой связи появление любого экспериментального подхода, дающего информацию о пространственной архитектуре таких макромолекулярных компонентов, как вирусные частицы, фаги, субклеточные структуры (рибосомы, нуклеосомы, хромосомы, мембранные структуры и др.) и даже целые клетки, представляет большой интерес. Ниже мы рассмотрим на ряде примеров возможность приложения метода тритиевой планиграфии для решения конкретных задач структурной биологии.

4.1. Исследование структуры рибосом

Рибосома является молекулярной машиной, осуществляющей синтез всех белков во всех живых организмах. Эта клеточная органелла представляет собой сложно организованный рибонуклеопротеидный комплекс огромной молекулярной массой, составляющей около 2.5 млн Да. Прокариотическая рибосома, считающаяся наиболее просто устроенной, содержит в своем составе две высокополимерные и одну низкомолекулярную молекулы рибосомных РНК (23S, 16S и 5S соответственно), а также 52 белка. Полную рибосому составляют две субъединицы, большая и малая (для прокариот 50S и 30S соответственно). Рибосома диссоциирует на субъединицы при понижении концентрации ионов магния. Принципиальным структурным отличием

рибосомы от простых РНКсодержащих вирусов является ее асимметричная архитектура: субъединицы рибосомы различны по размеру, они отличаются наборами входящих в их состав белков и РНК, имеют разную морфологию. Все 52 рибосомных белка представляют собой разные полипептидные цепи, их расположение в структуре субъединиц, как и морфология укладки РНК, полностью асимметричны. Поэтому понятно, что решение пространственной структуры такого массивного и сложно устроенного комплекса является далеко не тривиальной задачей.

Выяснение механизма работы рибосомы является одной из самых интересных и сложных проблем молекулярной биологии. Детальная структура рибосомы, равно как и механизм ее функционирования на молекулярном уровне, остаются до сих пор невыясненными, несмотря на значительный прогресс, достигнутый в этой области в последние годы: удалось получить кристаллы, пригодные для рентгеноструктурного анализа, и получить информацию о структуре большой субъединицы рибосомы с разрешением в 9 \AA [21]. Это, безусловно, значительный прорыв в структурных исследованиях рибосомы, однако достигнутое разрешение не позволяет различить в структуре отдельные белки. Кроме того, как и в случае меньших макромолекул, слежение за участвующими в трансляции макромолекулами, за изменениями их конформаций и конформационной подвижностью самой рибосомы представляется проблематичным в рамках общепринятой методологии, включающей в себя такой мощный метод, как рентгеноструктурный анализ.

В процессе своего функционального цикла рибосома взаимодействует с целым рядом макромолекулярных лигандов, таких, как мРНК, тРНК, белковые факторы трансляции. Эти крупные лиганды взаимодействуют с определенными участками рибосомной поверхности, имеющими сродство к тому или иному фактору или субстрату (участки связывания), и поэтому знание топографии поверхности рибосомы имеет большое значение для детального выяснения механизма ее функционирования.

Многочисленные экспериментальные подходы были разработаны для изучения рибосомных белков, расположенных на поверхности субчастиц: иммуноэлектронная микроскопия для локализации экспонированных участков рибосомы, химические сшивки соседних белков, химическая и энзиматическая модификация доступных белков и другие. Тем не менее, ни один из

применявшихся методов не является в полном смысле прямым подходом для измерения экспонированности белков на рибосомной поверхности, что и объясняет трудности в интерпретации таких данных и их противоречивость. Это послужило основанием для поиска альтернативного метода маркирования поверхности рибосомы. Тритиевая планиграфия, являясь, по всей видимости, единственным прямым методом измерения экспонированности компонентов макромолекулярных комплексов, оказалась весьма перспективной для исследования рибосомы. Были найдены условия тритиевого мечения, не повреждающие ни один из компонентов рибосомы [4, 18, 103]. А такие характеристики метода, как малая глубина проникновения атомарного трития вглубь молекулы белка, позволяющая метить только тонкий поверхностный слой с глубиной в $\sim 5 \text{ \AA}$, а также одинаковая вероятность включения метки в аминокислотные остатки при условии их равной пространственной доступности, позволили определить экспонированные белки рибосомы и ее комплексов с некоторыми лигандами, а также обнаружить экспонированность синтезируемого рибосомой пептида.

Рибосома *E. coli* является, по сути, первым сложным макромолекулярным комплексом, к исследованию которого был привлечен метод тритиевой планиграфии. Этим работам предшествовали многочисленные эксперименты, направленные на подбор условий введения метки, обеспечивающих сохранность объекта (а рибосома представляет собой весьма лабильный и чувствительный к любого рода воздействиям комплекс), отработка методов количественного анализа распределения метки между компонентами. Выраженная асимметрия как самой рибосомы, так и ее субчастиц, потребовала такого способа приготовления образца-мишени, который полностью исключал бы возможность селективной ориентации частиц на поверхности раздела фаз. Таким способом оказался описанный выше прием быстрого замораживания капель суспензии с их последующим механическим измельчением.

Цельный комплекс исследований был проведен с нуклеиновыми компонентами рибосомы, 5S и 16S РНК [8], в результате которых было установлено, что меченые препараты РНК даже при сравнительно высокой удельной радиоактивности (30–120 Ки/ммоль) сохраняют свою целостность и способность к специфическому нуклеиново-белковому взаимодействию. Так,

меченая 16S РНК из *E. coli* связывала рибосомные белки малой (30S) субчастицы, что приводило к реконструкции нативной структуры нуклеопротеидного комплекса.

Было найдено, что при давлении трития в 2×10^{-4} торр и температуре спирали в 1800 К рибосомы сохраняют не только свои гидродинамические характеристики (коэффициент седиментации остается 70S), но и целостность рибосомной РНК и белков [18].

Эксперименты по тритиевой планиграфии рибосом, на результатах которых мы далее остановимся более детально, не только позволили решить несколько важных вопросов о структуре этой уникальной частицы, но и представляют общеметодологический интерес.

4.1.1. Белки поверхности рибосомы

Мечение рибосомных белков в денатурирующих условиях. Денатурация тотального рибосомного белка в растворах уксусной кислоты вызывает разворачивание глобул каждого индивидуального белка и тем самым приводит каждый из аминокислотных остатков к состоянию равной пространственной доступности. Если подвергнуть такой препарат денатурированного белка мечению атомарным тритием, то количество трития, включающегося в каждый белковый компонент, должно быть пропорциональным его молекулярной массе. Мечение атомарным тритием тотального рибосомного белка, экстрагированного из рибосом и денатурированного уксусной кислотой, обнаружило такую пропорциональность. Меченые белки разделяли с помощью двумерного электрофореза, окрашивали кумасси голубым G-250, вырезали белковые пятна из геля и растворяли в 30%-ной перекиси водорода [18]. Радиоактивность полученных гомогенных растворов измеряли в сцинтилляционном счетчике. Распределение радиоактивности по рибосомным белкам представлено на рис. 4.1. Видно, что включение трития в белки действительно пропорционально их молекулярным массам или площадям доступной поверхности и не зависит от аминокислотного состава белка. Этот результат показал, что бомбардировку атомарным тритием можно применять для количественного измерения экспонированности белков на поверхности рибосомы.

Белки, экспонированные на поверхности интактной 70S рибосомы. При мечении интактных 70S рибосом распределение три-

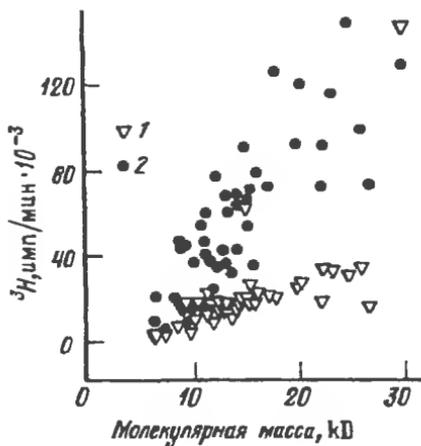
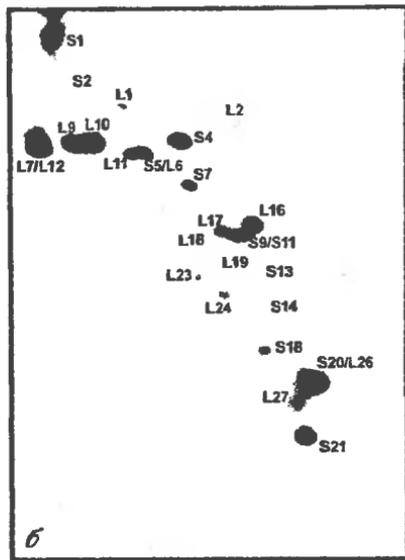
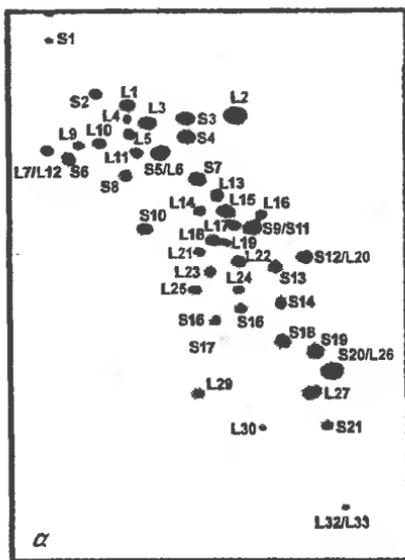


Рис. 4.1. Зависимость включения атомарного трития в денатурированный рибосомный белок от его молекулярной массы

1 – тритиевая радиоактивность индивидуальных белков, меченных в растворе 67%-ной и 2 – в растворе 5%-ной уксусной кислоты соответственно

Рис. 4.2. Разделение рибосомных белков с помощью двумерного электрофореза в денатурирующих условиях

Мечение белков атомарным тритием в составе 70S рибосомы было проведено при концентрации ионов Mg^{2+} 10 мМ. а – фотография геля, окрашенного куасси голубым G-250, б – флюорограмма того же геля



тия по индивидуальным белкам оказывается существенно неравномерным и не связано напрямую с молекулярными массами. На рис. 4.2 приведены фотография пластины геля двумерного электрофореза рибосомных белков и флюорограмма этого же геля. Полное совпадение радиоактивных зон (флюорограмма) с окрашенными пятнами на геле свидетельствует о том, что в процессе мечения белки не претерпели деградации или модификаций, сказывающихся на их подвижности в условиях двумерного электрофореза. Анализ флюорограмм позволяет вы-

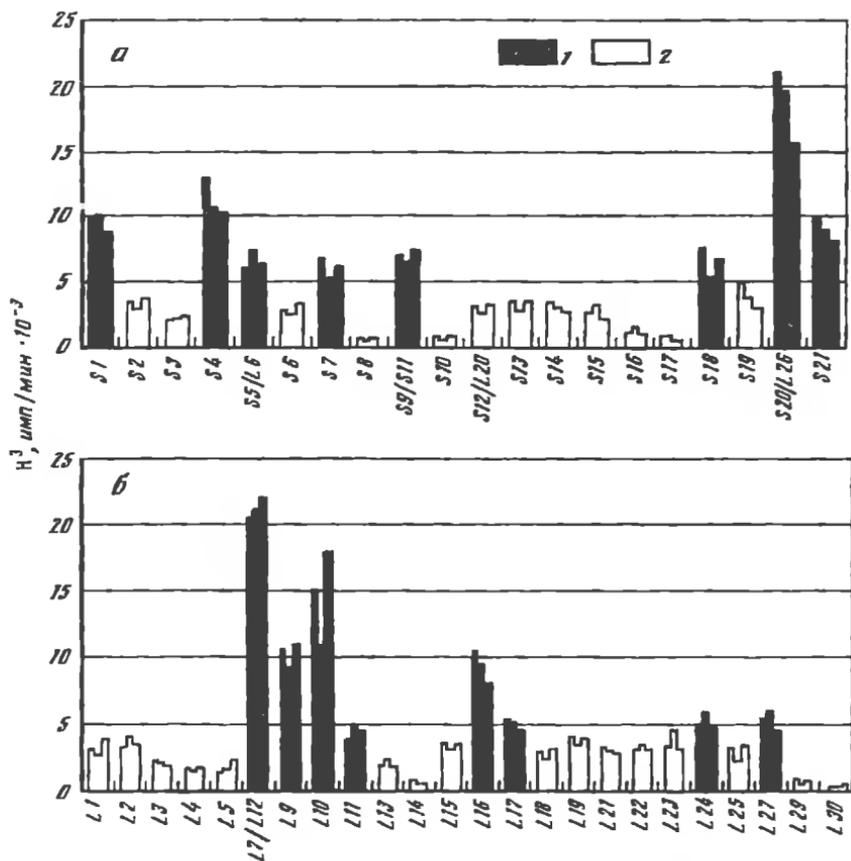


Рис. 4.3. Количественный анализ распределения тритиевой радиоактивности по рибосомным белкам, меченым в составе 70S рибосомы при 10 мМ Mg^{2+}
 а – белки малой субъединицы 70S рибосомы, б – белки большой субъединицы

делить группу наиболее сильно меченых белков. К таковым можно отнести белки малой субъединицы S1, S4, S6, S7, S9 и/или S11, S18, S20 и S21, а также L7/L12, L9, L10, L11, L17, L24 и L28 большой субъединицы. Это означает, что на поверхности 70S рибосомы существенно экспонирована только небольшая часть белков. Количественные измерения радиоактивности с помощью солюбилизации участков геля двумерного электрофореза (рис. 4.3) позволили выявить группу белков, практически не представленных на рибосомной поверхности. К ним относятся белки S3, S8, S10, S12, S14, S16, а также L14, L20, L29, L30, L32, L33 и L34. Остальные белки экспонированы на поверхности рибосомы в средней степени.

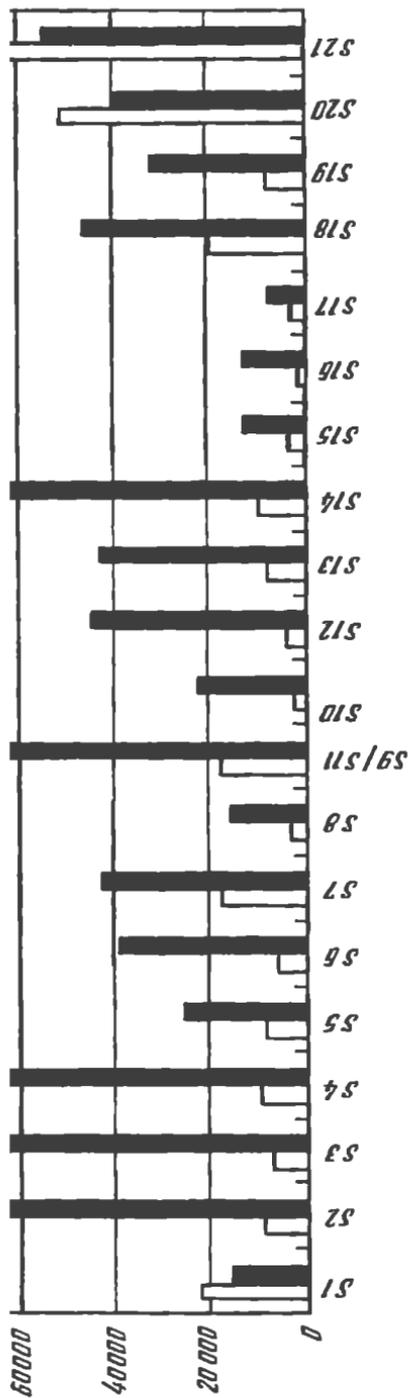


Рис. 4.4. Распределение тритиевой радиоактивности по белкам рибонуклеопротеида, полученного при разворачивании субъединиц рибосомы в безмагнитной среде

1 - радиоактивность развернутых нуклеотопроцедных тэжей; 2 - радиоактивность белков компактных 30S и 50S субъединиц диссоциировавшей рибосомы. а - белки малой субъединицы, б - белки большой субъединицы

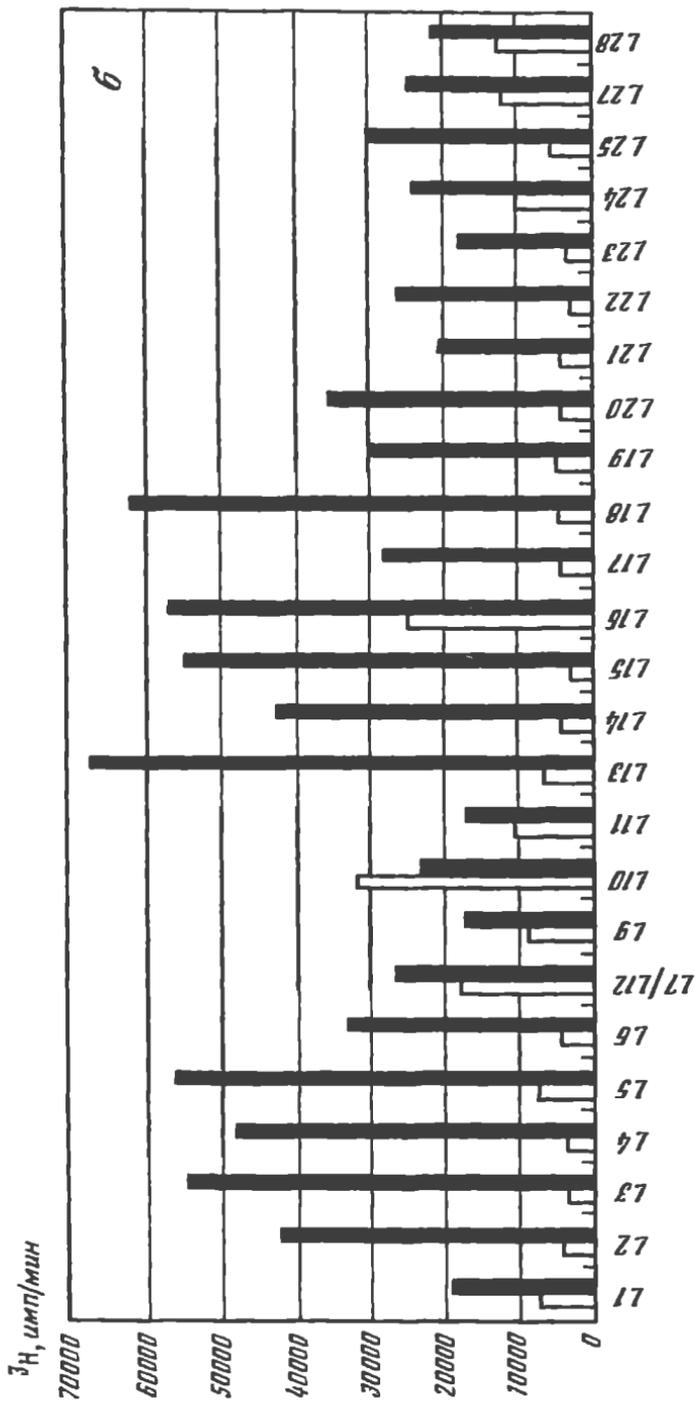


Рис. 4.4. (окончание)

Важно отметить, что самыми экспонированными на поверхности рибосомы являются белки S1 и L7/L12. Этот результат не является неожиданным, поскольку белок S1, являясь самым крупным из рибосомных белков, связан с малой субъединицей достаточно лабильно и легко уходит из рибосомы при отмывке, что предполагает его локализацию на поверхности частицы. Белок L7/L12 составляет один из протуберанцев большой субъединицы вместе с белками L10 и L11, находящимися в основании протуберанца и должен быть полностью экспонированным. Неожиданным оказалось слабое включение метки в белок L1, входящий в состав другого протуберанца 50S субчастицы. По всей видимости, этот белок экранирован рибосомной РНК, что представляется весьма вероятным, поскольку данные о распределении положительных зарядов на его поверхности предполагают сильное взаимодействие рибосомной РНК с обоими доменами этого белка [69]. Подобным образом экранированы, видимо, и белки L5, L18 и L25, входящие в состав центрального протуберанца.

Мечение атомарным тритием развернутых рибонуклеопротеидов, в которые превращается рибосома при понижении концентрации ионов магния в среде, подтверждает выводы об экспонированности белков на интактной рибосоме: белки S1, S20, S21, L7/L12 и L5 не меняют своей экспонированности при разворачивании рибосомы, поскольку являются полностью экспонированными в составе нативной частицы (рис. 4.4). Экспонированность остальных белков при разворачивании в той или иной степени возрастает, что свидетельствует о их экранированном (или частично экранированном) состоянии в составе рибосомы.

Иммуноэлектронная микроскопия [51, 56, 82, 83] обнаруживает на поверхности рибосомных частиц антигенные детерминанты очень многих рибосомных белков. Это, однако, не свидетельствует об их сильной экспонированности, так как детер-



Рис. 4.5. Распределение тритиевой радиоактивности по белкам 30S субъединицы рибосомы, меченной в виде эквимольной смеси обеих субъединиц (в растворе с 1 мМ Mg²⁺), и в составе недиссоциированной 70S рибосомы

Радиоактивность каждого белка приведена в процентах к общей радиоактивности, присутствующей в геле; каждый столбец соответствует независимому эксперименту. 1 – показана радиоактивность белков недиссоциированной 70S рибосомы, 2 – диссоциированной (смеси субъединиц)

15

121

10

5

1  2 

минанты могут иметь очень небольшой размер. В то же время энзиматическое йодирование поверхности рибосом выявляет весьма ограниченный набор экспонированных белков. Это белки S3, S7, S9, S10, S18, L2, L5, L6, L10 и L11 [63]. Следует, правда, оговориться, что энзиматическое йодирование выявляет скорее экспонированность тирозиновых остатков (только они способны включать йод), чем экспонированность самих белков. Это объясняет разницу в результатах, полученных при йодировании и мечении атомарным тритием.

Количественные данные, полученные с помощью прямого метода определения поверхностной локализации белков, чрезвычайно важны для последующих исследований взаимодействия рибосомы с ее природными лигандами и антибиотиками, поскольку позволяют фиксировать небольшие изменения экспонированности, не детектируемые с помощью флюорографии.

Белки на контактирующей поверхности 30S и 50S субъединиц рибосомы. Поверхность контакта рибосомных субъединиц в составе 70S рибосомы, называемая также "интерфейсом", является функционально важным элементом рибосомы. Можно предположить, что белки, находящиеся на интерфейсе, должны экранироваться от атомарного трития рибосомными субъединицами и становиться доступными лишь при диссоциации рибосомы. Для обнаружения и идентификации белков на контактной поверхности было проведено мечение рибосом атомарным тритием при концентрации ионов магния 1 мМ [103, 104]. При этой концентрации магния рибосома полностью диссоциирует, и суспензия рибосом представляет собой эквимольярную смесь субъединиц.

Распределение тритиевой метки по рибосомным белкам, меченым в составе диссоциированной рибосомы (смеси субъединиц) и интактной 70S рибосомы, приведено на рис. 4.5; 4.6, из которых следует, что диссоциация рибосом не приводит к допол-



Рис. 4.6. Распределение тритиевой радиоактивности по белкам 50S субъединицы рибосомы, меченной в виде эквимольярной смеси обеих субъединиц (в растворе с 1 мМ Mg^{2+}), и в составе недиссоциированной 70S рибосомы

Радиоактивность каждого белка приведена в процентах к общей радиоактивности, присутствующей в геле; каждый столбец соответствует независимому эксперименту. 1 – показана радиоактивность белков недиссоциированной 70S рибосомы, 2 – диссоциированной (смеси субъединиц)

нительному экспонированию рибосомных белков – результат, свидетельствующий об их отсутствии на поверхности межсубъединичного контакта. Полученные в этих экспериментах данные показывают, что взаимодействие субъединиц осуществляется в основном благодаря рибосомной РНК, и ни один рибосомный белок прямо не вовлечен в реализацию межсубъединичного контакта.

Единственным белком, экспонированность которого возрастает в несколько раз при диссоциации рибосомы, является до сих пор неидентифицированный белок, представленный на геле двумерного электрофореза пятном Y. Этот белок, не являясь рибосомным, присутствует в небольших количествах в препаратах рибосом. По всей видимости, именно белок Y располагается на контактирующей поверхности, поскольку при реассоциации субъединиц в 70S рибосому за счет повышения концентрации ионов магния до 10 мМ этот белок вновь становится экранированным. Следует отметить, что обратимое экспонирование/экранирование белка Y может служить контролем применимости метода в экспериментах по поиску белков рибосомального интерфейса.

Белки, отнесенные к области контакта на основании результатов техники химических сшивок [1, 22, 37, 38, 58], следует, вероятно, разместить на периферии интерфейса, поскольку, по данным тритиевой планиграфии, все они одинаково хорошо доступны атомарному тритию как в ассоциированной 70S рибосоме, так и в 30S и 50S субъединицах.

4.1.2. Корректировка пространственной модели расположения белков на 30S субъединице

Знание пространственного расположения белков в составе рибосомы и ее субчастиц является необходимым условием для выяснения молекулярных механизмов ее функционирования. Каноническая пространственная модель 30S субчастицы с расположением всех ее индивидуальных белков [35] была создана на основании трех экспериментальных подходов: химических сшивок соседних белков [32, 57], иммуноэлектронной микроскопии [82, 83] и определения расстояний между центрами масс рибосомных белков с помощью техники нейтронного рассеяния [66]. Все эти методы едва ли могут быть отнесены к разряду "прямых". Метод тритиевой планиграфии – один из немногих,

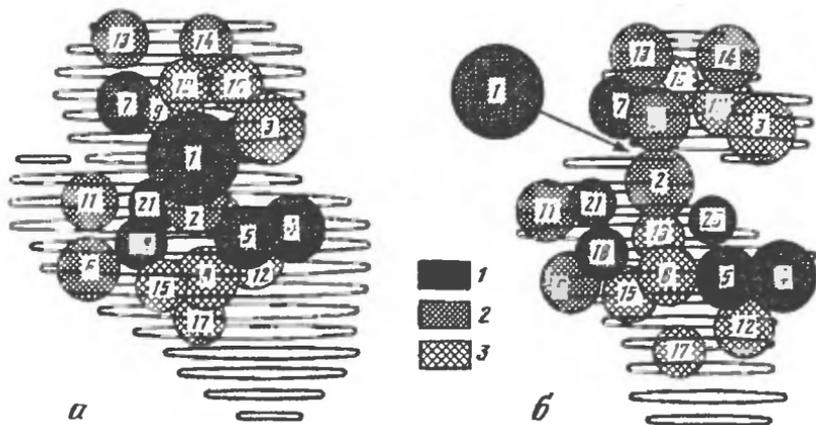


Рис. 4.7. Модели расположения белков рибосомной 30S субъединицы

Белки вписаны в электронно-микроскопический контур субъединицы, показанный серыми линиями, и окрашены в соответствии с данными мечения рибосомы атомарным тритием; 1 – белки, хорошо экспонированные на поверхности субъединицы; 2 – белки, умеренно экспонированные на поверхности; 3 – белки, спрятанные внутри частицы

а – модель Мура [35], *б* – уточненная модель [17]

если не единственный прямой подход для установления экспонированности компонентов на поверхности объекта. Данные, полученные для изолированной 30S субъединицы [4, 17] и диссоциированной рибосомы [103, 104], показали, что существующая модель 30S субчастицы нуждается в существенной корректировке. Прежде всего пришлось изменить положение целого ряда белков, ранее предположительно локализованных на поверхности контакта 30S и 50S субчастиц в 70S рибосоме. Эти белки были перемещены к периметру зоны контакта, где их экспонированность не изменялась при ассоциации субъединиц. Часть белков, которые, по данным тритиевой планиграфии, оказались недоступными или малодоступными для включения метки, пришлось "переместить" в глубину субчастицы. Напротив, белки, экспонированные для трития, но в классической модели отнесенные к категории "спрятанных", были "выведены" на поверхность модели [17]. В результате в новой пространственной модели (см. рис. 4.7) белок S3 уведен с поверхности внутрь субъединицы, а белки S4, S5, S7, S18, S20 и S21 выведены на поверхность, "обращенную" от 50S субъединицы. Положение белков S13 и S14 оставлено без изменений, а белок S2 смещен из глубины субчастицы так, что стал доступен с поверхности.

Контакт с субчастицей белка S1, наиболее сильно экспонированного на рибосоме, сведен к минимуму: S1 расположен открыто и полностью доступен атомарному тритию.

4.1.3. Экспонированность синтезируемого полипептида на поверхности рибосомы

Ближайшее окружение синтезируемого рибосомой полипептида всегда было предметом повышенного исследовательского интереса, поскольку это именно та среда, в которой происходит сворачивание полипептидной цепи в уникальную пространственную структуру биологически активного белка. Долгое время принято было считать, что растущий пептид проходит по так называемому рибосомному каналу – туннелю внутри большой субъединицы, проходящему от пептидил-трансферазного центра на интерфейсе к домену выхода. Концепция канала основывалась на том, что рибосома защищает от протеолиза 30–40 аминокислотных остатков растущего пептида [28, 62, 76], а домен выхода пептида на поверхность рибосомы обнаруживается на противоположной интерфейсу стороне большой субъединицы [25], вдали от пептидил-трансферазного центра, где синтезируется пептидная связь. В то же время существует ряд экспериментальных данных, противоречащих концепции канала (см. обзор [12]).

Для определения длины рибосомного канала были предприняты эксперименты по изучению экспонированности синтезируемого пептида на рибосомной поверхности с помощью меченая атомарным тритием [11]. Рибосомы, "заряженные" растущими полипептидными цепями, получали в бесклеточной системе трансляции, программированной полиурициловой кислотой в присутствии [¹⁴C]-фенилаланина. При этом на рибосомах синтезировались радиоактивные полифенилаланиновые пептиды, оставшиеся связанными с рибосомой в виде пептидил-тРНК. Такие рибосомы выделяли с помощью центрифугирования в градиенте сахарозы и подвергали бомбардировке атомарным тритием. Аналитический сахарозный градиент с последующей пуромициновой реакцией в его фракциях показал, что процедура меченая не вызывала ни деструкции рибосом, ни выпадения пептидил-тРНК. Более того, рибосомы сохраняли компетентность к пуромицину, что свидетельствовало о сохранности их функциональной активности.

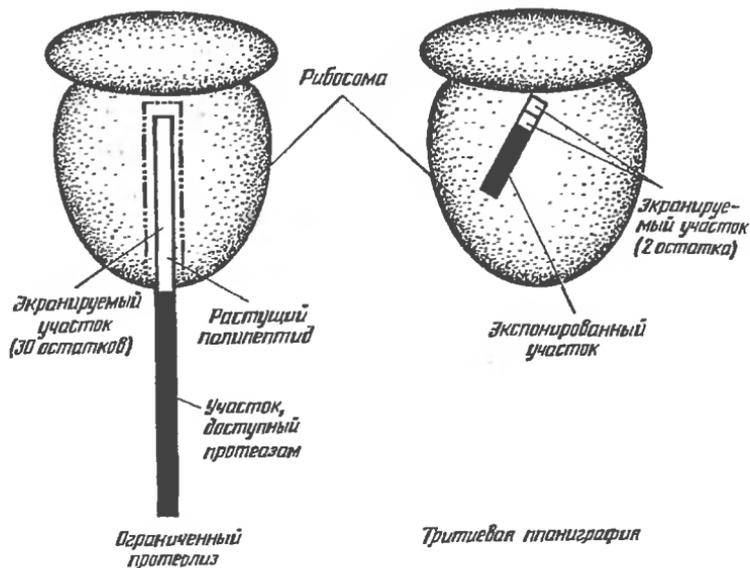


Рис. 4.8. Определение величины участка растущей полипептидной цепи, скрытого внутри рибосомы от воздействия внешних агентов

Рибосома защищает от атомарного трития только два С-концевых аминокислотных остатка, в то время как от протеолитической атаки защищены около тридцати остатков

Полифенилаланиновые пептиды из меченых рибосом выделяли экстракцией в этилацетат, и дальнейший анализ проводили с помощью высокоэффективной жидкостной обращенно-фазной хроматографии. Элюирование смеси пептидов в градиенте вода-метанол позволило разделить полифенилаланины разной длины. Особенно хорошо разрешались фракции, содержащие ди-, три- и тетрапептиды. Измерение радиоактивности фракций элюата показало совпадение распределения радиоактивности трития и углерода-14, причем соотношение между содержанием трития и углерода было примерно одинаковым для всех фракций, кроме фракции трифенилаланина, где содержание трития было выше. Наблюдаемое включение трития в пептидную цепь длиной всего в три аминокислотных остатка свидетельствует об их экспонированности на рибосомной поверхности. Таким образом, было продемонстрировано, что даже очень короткие пептиды экспонированы на поверхности, а не находятся в рибосомном канале-туннеле (рис. 4.8). Вывод об отсутствии канала был проверен также и на химически синтезированном пептиде $\text{CF}_3\text{COGlyAlaAla}^{[14]\text{C}}\text{Phe}$, связанном с рибосомой в виде предсинтезированной пептидил-тРНК. Анализ распределения трития

по аминокислотным остаткам этого пептида, полученным после полного кислотного гидролиза, показал значительное включение трития уже во второй от С-конца остаток [11]. По всей видимости, экспонированность пептидов на рибосомной поверхности не зависит от природы аминокислотных остатков.

Причины, по которым С-концевой сегмент растущего пептида оказывается недоступным протеолитическим ферментам, состоят, по-видимому, не только в стерических препятствиях, не позволяющих молекуле фермента подойти достаточно близко к примыкающему непосредственно к рибосоме участку пептида, но и в экранировании растущей цепи белками, ассоциированными с ней. Такие белки были недавно обнаружены. Так, защита синтезируемого эукариотической рибосомой пептида от протеолитической атаки обеспечивается наличием специального белка NAC, способного обратимо связываться с синтезируемой полипептидной цепью [91]. На прокариотической рибосоме таким защищающим белком может являться trigger-фактор [48, 81, 89]. Шапероны, обратимо взаимодействующие с синтезируемой полипептидной цепью, также могут вносить вклад в ее экранирование от протеолитической атаки.

Таким образом, использование метода тритиевой планиграфии позволяло прямо и однозначно решить несколько принципиально важных вопросов структурной организации и механизмов функционирования столь важного объекта, каковым является рибосома. В первую очередь следует упомянуть количественные данные по экспонированности белков на поверхности рибосомы. Были выявлены наиболее сильно экспонированные белки (S1, S4, S6, S7, S9 и/или S11, S18, S20, S21, L7/L12, L9, L10, L11, L17, L24 и L28) и белки, практически не представленные на рибосомной поверхности (S3, S8, S10, S12, S14, S16, L14, L20, L29, L30, L32, L33 и L34). Экспонированность остальных белков также определена количественно.

С помощью тритиевой планиграфии было установлено отсутствие белков на поверхности межсубъединичного контакта, поскольку диссоциация рибосом на субъединицы не приводила к сколько-нибудь значительному дополнительному экспонированию какого-либо рибосомного белка. В тех же экспериментах было обнаружено, что белок Y, не идентифицированный как рибосомный, локализуется в межсубъединичном пространстве на рибосомном интерфейсе.

Количественные данные по экспонированности белков малой рибосомной субъединицы позволили пересмотреть каноническую модель пространственного расположения белков этой субъединицы и предложить уточненную модель, где положение многих белков подвергнуто существенной коррекции.

Третья планиграфия транслирующих рибосом, содержащих синтезируемые полипептидные цепи, выявила экспонированность на рибосомной поверхности пептидов длиной всего в три аминокислотных остатка. Это позволило поставить под сомнение общепринятую концепцию рибосомного канала для растущей полипептидной цепи.

4.2. Исследование структуры хромосом

Несмотря на интенсивные исследования структуры хромосом, изучение их морфологии с помощью электронной микроскопии, определение белкового состава хромосом, структурной организации их остова – скэффолда, митотического аппарата, локализации белков, формирующих внешнюю поверхность, остается малоизученной. Метод третьей планиграфии был применен для идентификации белков, локализованных на поверхности метафазных хромосом, выделенных разными методами [23, 24]. Тритированию были подвергнуты конденсированные (выделенные в присутствии полиаминов) Са-хромосомы и ЭДТА-деконденсированные хромосомы. Са-хромосомы использовали постольку, поскольку белки наружной поверхности полиаминных хромосом сильно экранированы слабосвязанной фракцией нехромосомных белков, что не позволяет полностью исследовать белки самих хромосом. Са-хромосомы имеют еще и то дополнительное преимущество, что хорошо изучена их деконденсация с помощью ЭДТА. Электронной микроскопией было показано, что морфологическая структура хромосом после приготовления мишени лиофилизацией замороженной пленки образца и процедуры облучения не меняется.

При анализе меченных тритием хромосом электрофорезом в полиакриламидном геле не удалось обнаружить каких-либо разрушений и деконденсации структуры. Меченые препараты конденсированных метафазных хромосом сохраняли также и их протеинкиназную активность. В работах [23, 24] впервые был исследован весь спектр белков, локализованных на наружной поверхности метафазных хромосом и было обнаружено, что в

хромосомах, выделенных двумя методами, белки фракции скэффолда являются основными белками, экспонированными на поверхности хромосом, что позволяет предположить, что именно они формируют наружную поверхность как хроматиноподобных фибрилл ЭДТА-деконденсированных хромосом, так и конденсированных метафазных хромосом. Фракция гистонов в значительно меньшей степени экспонирована на поверхности хромосом. Оказалось также, что часть наружных белков хромосом является фосфобелками. При этом было обнаружено, что в спектрах наружных фосфолипептидов конденсированных и ЭДТА-деконденсированных хромосом 9 фосфолипептидов с молекулярными массами 14, 28, 35, 45, 57, 67, 84 и 87 кДа совпадают. Их наружную локализацию, по данным тритиевой планиграфии, подтверждает и доступность их для иммобилизованных казеинкиназы 2 и щелочной фосфатазы.

В кратко рассмотренных выше работах информация о структуре надмолекулярных комплексов ограничивалась определением степени экспонированности ее компонентов в составе всей надмолекулярной структуры потока атомов трития. Более детальное исследование было проведено с вирусами, где информацию о структуре объекта получали из анализа внутримолекулярного распределения метки в белках, выделенных из меченых препаратов вирусов.

4.3. Топография доступной поверхности и структура вируса табачной мозаики

Вирион вируса табачной мозаики (ВТМ) представляет собой достаточно жесткий стержень, содержащий ~2130 индентичных субъединиц белка оболочки с молекулярной массой 17.5 кДа, собранных в правозакрученную спираль вокруг одноцепочечной РНК [29, 85]. Данные РСА для белка оболочки с разрешением 2.8 Å [30] и позже с разрешением 2.4 Å [26], а также для целого вируса табачной мозаики ВТМ (штамм U1) с разрешением 3.6 Å [67] и 2.9 Å [68] и детальная антигенная характеристика вирусного капсида [19] делали данный объект идеальной модельной системой при отработке методологии применения метода тритиевой планиграфии для исследования структуры макромолекулярных комплексов. Бомбардировке тритием подвергали быстро замороженные (стекловидноподобные) тонкие пленки суспензии вирусных частиц, приготовленные в условиях, исклю-

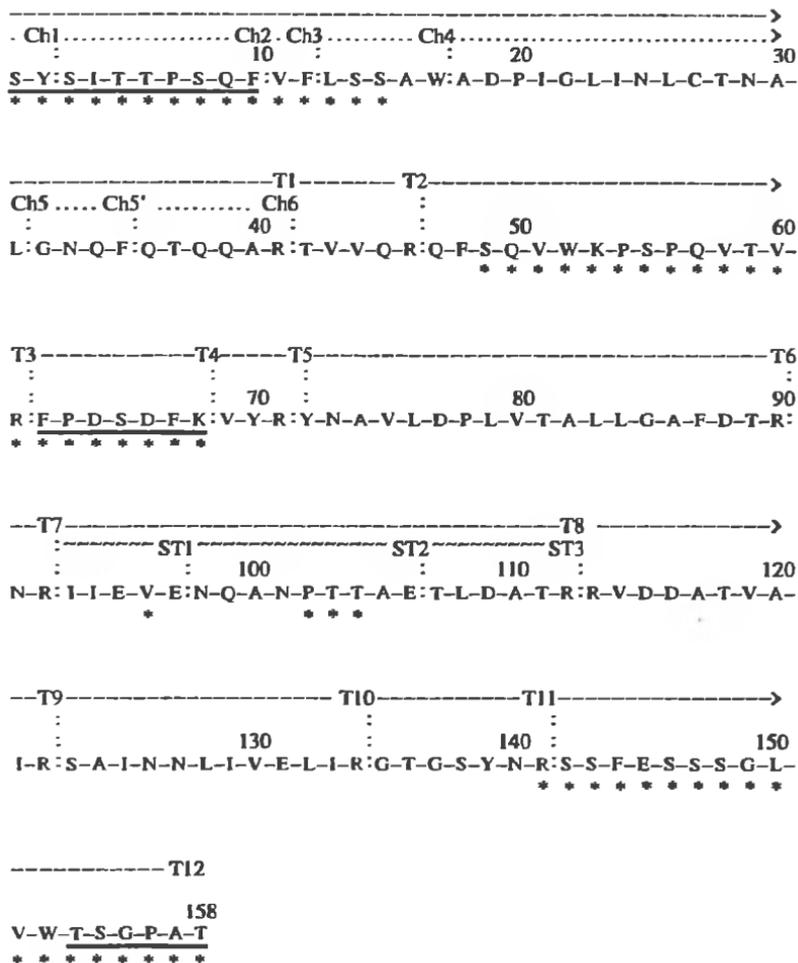


Рис. 4.9. Аминокислотная последовательность белка оболочки ВТМ согласно [87]

(---) – триптические пептиды T1-T12; (.....) – химотриптические пептиды триптического пептида T1 (ChT1-ChT6); (----) – стафилококковые пептиды триптического пептида T8(St.1-St.3); (***) – участки, доступные для включения тритиевой метки; (—) – антигенные детерминанты белка согласно [19]

чающих возможность селективной ориентации вирионов на поверхности замороженных растворов (техника "напыления" водных растворов на заранее охлажденную до температуры жидкого азота внутреннюю поверхность реакционного сосуда). Методология анализа внутримолекулярного распределения трития вдоль полипептидной цепи белка включала ферментативный гидролиз

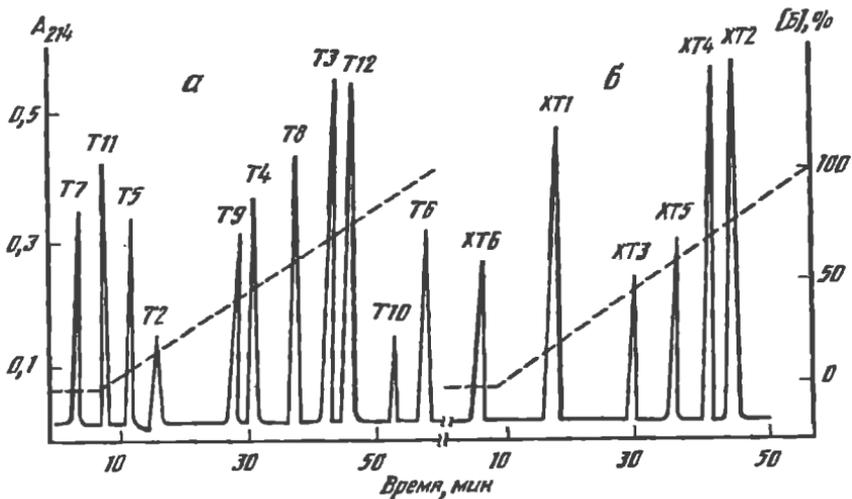


Рис. 4.10. Фракционирование пептидов белка оболочки ВТМ высокоэффективной жидкостной хроматографией в обращенной фазе

Колонка: Ultrasphere-octyl (5 мкм) 250 × 4.6 мм; детекция при 214 нм; состав подвижной фазы: А – 2.5%-ный изопропиловый спирт; Б – 50%-ный изопропиловый спирт, 0.2%-ная трифторуксусная кислота, 0.1%-ный триэтиламин; а – разделение триптических пептидов белка, б – разделение химотриптических пептидов пептида Т1 белка

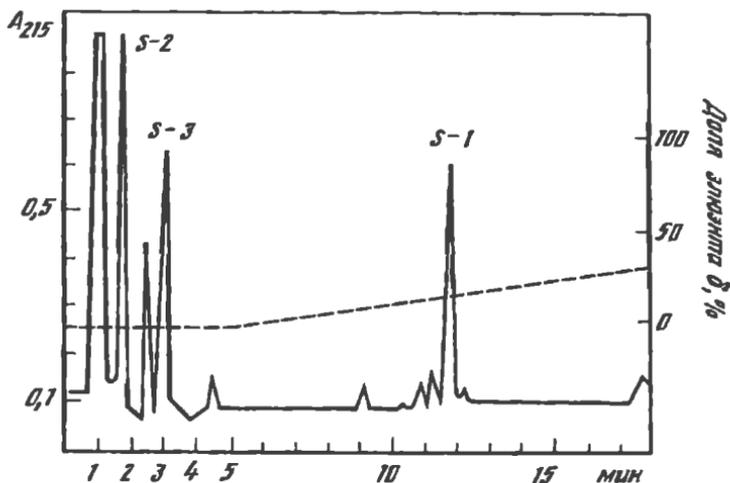


Рис. 4.11. Разделение продуктов гидролиза триптического пептида Т8 белка ВТМ протеазой V8

Условия хроматографии те же, что и на рис. 2

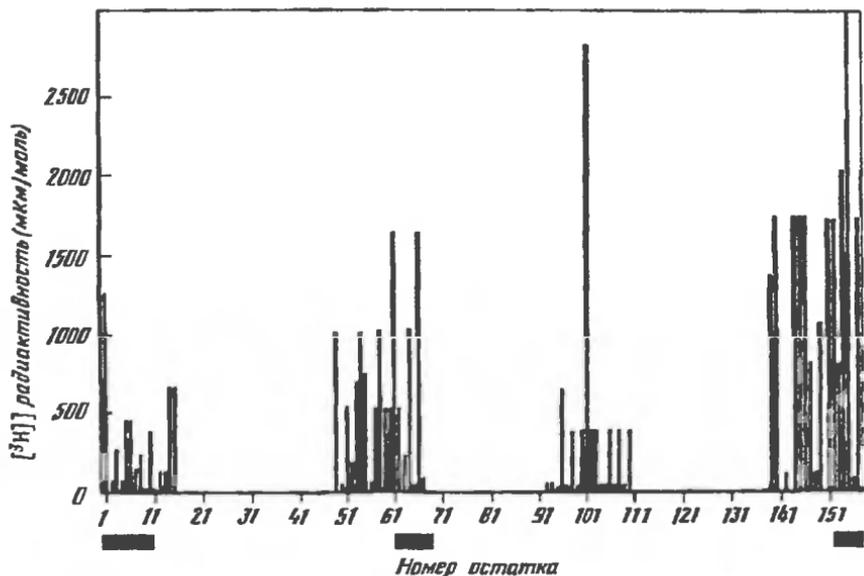


Рис. 4.12. Внутримолекулярное распределение метки в белке ВТМ

Прямоугольниками обозначены антигенные детерминанты белка в составе вируса [19]

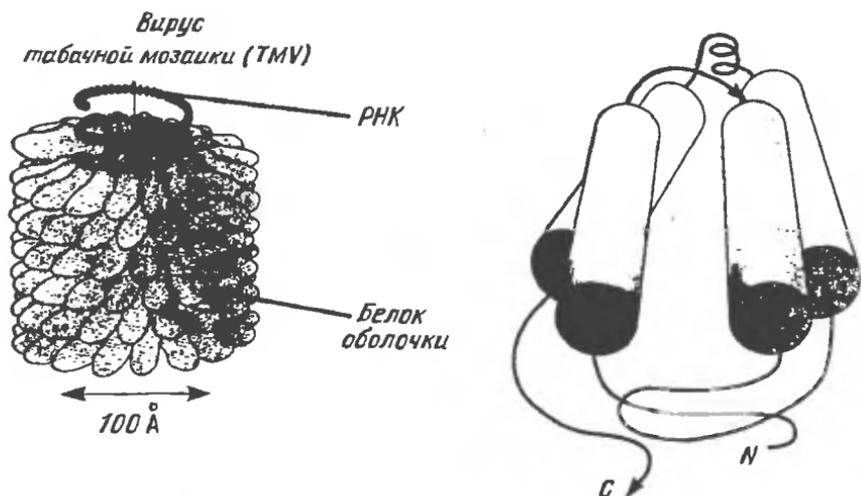


Рис. 4.13. Классический рисунок Don Caspar, схематически показывающий РНК и белок оболочки, формирующий чехол вируса табачной мозаики [36]

Справа – модель пространственной структуры белка оболочки, демонстрирующая расположение основных α -спиралей белка

белка с целью получения максимально большого числа коротких пептидов с минимальным числом повторяющихся аминокислот, фракционирование пептидных смесей высокоэффективной жидкостной хроматографией и аминокислотный анализ с одновременным счетом радиоактивности в элюате для определения удельного мечения аминокислот в составе каждого пептида. Крупные пептиды далее были расщеплены на более короткие ферментами иной специфичности (рис. 4.9). Для анализа внутримолекулярного распределения метки в белке были использованы протеазы: трипсин – для получения основного набора пептидов белка (см. рис. 4.10, а), химотрипсин и протеаза из *St. aureus* V8 – для дополнительного расщепления крупных триптических пептидов (рис. 4.10, б и рис. 4.11).

На рис. 4.12 представлен профиль доступности атомам трития аминокислотных остатков полипептидной цепи белка оболочки ВТМ в составе вириона. Видно, что для включения трития доступны четыре участка полипептидной цепи белка: остатки 1–15 пептида Т1, остатки 48–68 пептидов Т3 и Т4, остатки V₉₆, P₁₀₂ и один или оба треонина (Т₁₀₃ и Т₁₀₄) пептида Т8 и остатки 141–158, включающие С-концевую аминокислоту пептида Т11 и весь пептид Т12.

По данным рентгеноструктурного анализа, ВТМ имеет форму кукурузного початка длиной 3000 Å и радиусом 90 Å с центральным отверстием радиусом 20 Å [36]. Молекулы белка оболочки располагаются по спирали и на один ее шаг приходится 16.33 белковых субъединиц (рис. 4.13 и рис. 4.14). Вследствие тесного контакта между субъединицами белка на периферии вириона находятся лишь N- и С-концевые участки полипептидной цепи, соответствующие пептидам Т1 и Т12, а также участок, соответствующий пептидам Т3 и Т4 (рис. 4.15). Остатки аминокислот в этих пептидах, очевидно, должны быть доступны для горячих атомов трития, что и было показано экспериментально в опытах по тритированию вирусных частиц ВТМ. Неожиданным оказалось включение метки в остатки 96, 102–104 пептида Т8, который, по данным РСА, наиболее удален от внешней поверхности вириона и образует так называемую V-колонку, расположенную вертикально вдоль оси вируса. Этот пептид образует внутреннюю поверхность центрального канала вируса, в котором, согласно данным Стабс и др. [84], располагается вирусная РНК (рис. 4.16). Можно было предположить, что горячие атомы

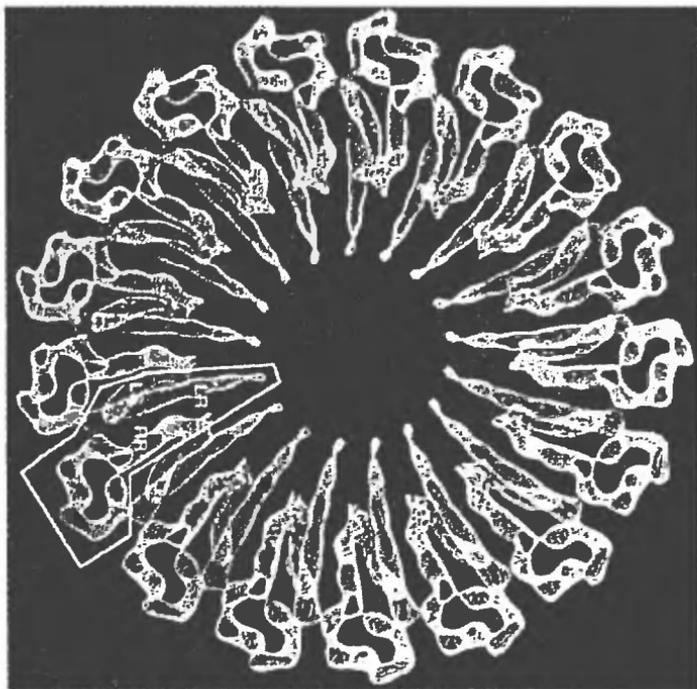


Рис. 4.14. Поперечное сечение карты электронной плотности низкого разрешения А-слоя в четырехслойном агрегате белка оболочки [26]

Легко можно видеть протяженную прямую в области малого радиуса А-слоя вблизи аксиального отверстия двухслойного диска, где ожидалось увидеть неупорядоченную цепь белка

третия проникают во внутренний канал вириона через торцевые отверстия и таким образом достигают внутреннего пептида. В этом случае отношение активностей периферических пептидов (Т1, Т12 и др.) и пептида Т8 должно соответствовать площадям бомбардируемой поверхности, т.е. не превышать нескольких процентов. Опыт же свидетельствует о практически одинаковой доступности остатков в этих пептидах. Предположить, что часть потока атомов трития проникает через слой плотно упакованной белковой субъединицы, а это структура из двух пар α -спиралей с обширным гидрофобным ароматическим кластером между ними, тем более трудно, что следует, из всех экспериментов с простыми глобулярными белками [3]. Оставалось допустить, что проникновение трития внутрь вириона происходит через межсубъединичные пространства в местах контакта трех субъединиц: двух субъединиц из одного ряда и одной из соседнего витка.

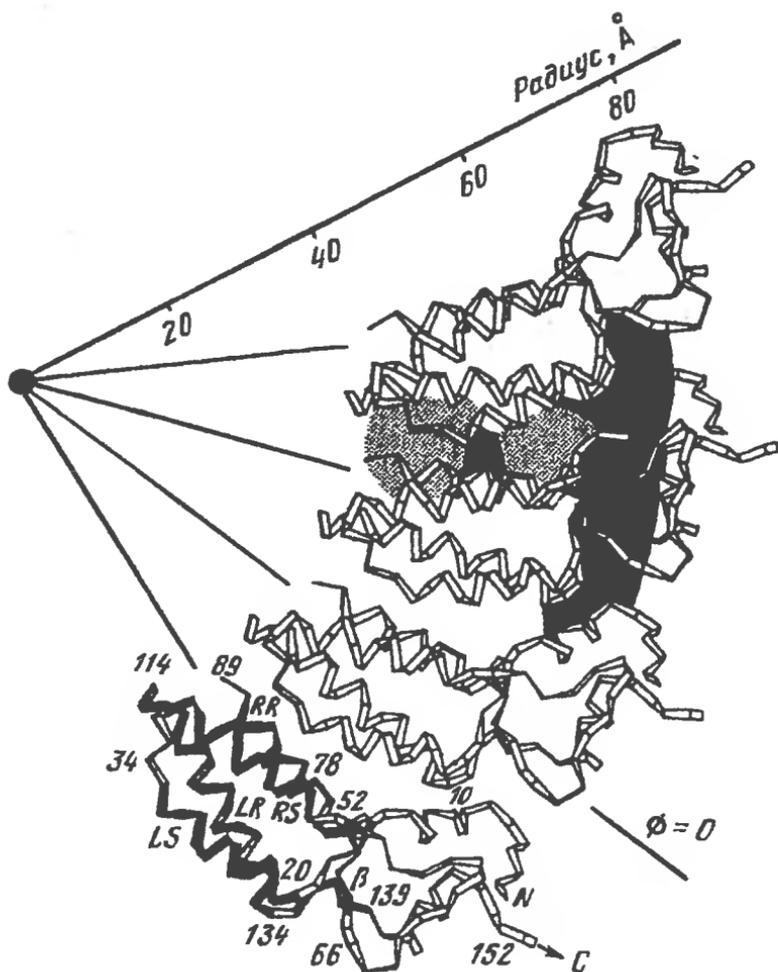


Рис. 4.15. Вид сверху хода полипептидной цепи и латеральных взаимодействий между четырьмя субъединицами внутри А-слоя [30]

Обозначены N- и C-концы цепи и основные 4 α -спирали: LS и RS в верхнем слое молекулы и RR и LR в нижнем слое

В самом деле, как следует из данных рентгеноструктурного анализа [36, 68], между соседними белковыми субъединицами имеются области с пониженной электронной плотностью диаметром до 5 Å, что вполне достаточно для проникновения через них атомов трития с радиусом 0.9 Å (рис. 4.15 и 4.16). По всей видимости, именно через эти каналы и происходит включение метки в проксимальный пептид T8 белка оболочки ВТМ. Суммарная площадь этих межсубъединичных каналов составляет в расчете на один вирион $\sim 80\,000 \text{ \AA}^2$, что сопоставимо с общей пло-

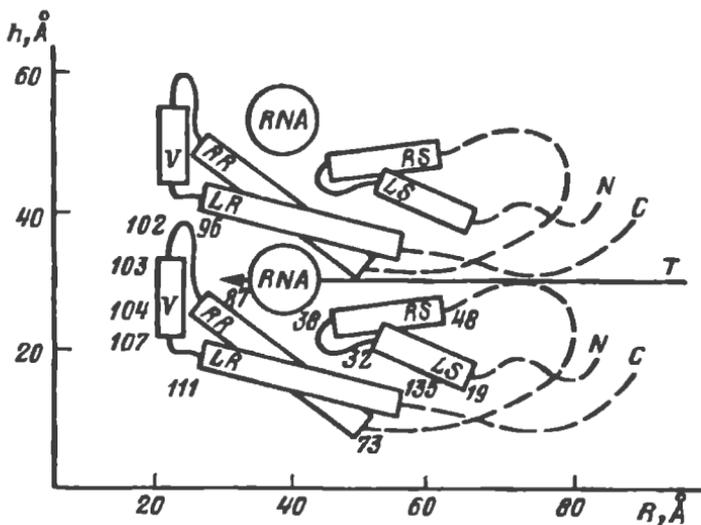


Рис. 4.16. Схематическое представление укладки белковых субъединиц в вирионе ВТМ, демонстрирующее возможность проникновения атомов трития во внутренние области вириона [84]

R – радиус вирусной частицы, h – ее "высота" по центральной оси (в Å)

щадью доступной поверхности достаточно большого белка, как, например, сывороточный альбумин человека (50 000 Å²).

В пользу прохождения атомов трития через боковые каналы говорит и тот факт, что метка в пептиде Т8, состоящем из 20 остатков аминокислот, локализована всего в трех-четыре остатках (см. рис. 4.16), которые, по всей видимости, и располагаются "напротив" входного отверстия канала. Подобным образом, а не через торцевые части, происходит и включение метки в молекулу РНК.

Препараты РНК, выделенные из меченных тритием образцов вируса, действительно содержали значительную радиоактивность, сохраняющуюся даже после 15-кратного переосаждения ее этиловым спиртом. Для того чтобы исключить вклад в общую радиоактивность РНК, радиоактивности, которая может привноситься за счет обмена образца с тритиевой водой и механизму Вильсбаха [99], были проведены контрольные опыты. Препараты ВТМ инкубировали в меченом ³H-фосфатном буфере с высокой радиоактивностью в течение 5–7 сут., затем выделяли РНК и анализировали. Удельная радиоактивность этой РНК была на порядок меньше удельной радиоактивности образцов

РНК, выделенных из препаратов вируса, меченных пучком горячих атомов трития.

Эти результаты разрушили привычный образ ВТМ, представляемого как кукурузный початок с плотно пригнанными одна к другой субъединицами белка, образ, поддерживаемый в нашем сознании, в частности, тем фактом, что вирусная РНК недоступна для действия различных нуклеаз и модифицирующих агентов [36]. Очевидно, что малый радиус трития позволяет ему проникать в такие "отверстия", которые недоступны для более крупных тестирующих частиц, к которым можно отнести не только нуклеазы, но и низкомолекулярные модификаторы.

Информация о местах с пониженной плотностью упаковки чрезвычайно важна как для получения точных представлений о пространственной архитектуре надмолекулярного комплекса, так и для выявления мест с повышенной молекулярной подвижностью составляющих фрагментов полипептидной цепи. Последнее может иметь принципиальное значение для понимания механизма функционирования комплекса.

Отличить истинно поверхностные участки и участки, находящиеся как бы на "дне" колодцев, куда не могут проникнуть атомы трития без рассеяния, можно, поставив специальные эксперименты с различными временами экспозиции. Так как поток атомов, падающих на поверхность, всегда больше потока, проходящего через узкий канал, то достижение уровня насыщения по удельной активности будет происходить для поверхностных участков за меньшие времена. Действительно, эксперименты с разными временами экспозиции потоку атомов трития, поставленные на двух штаммах ВТМ (штаммы $U1$ и t_s , температурный мутант дикого штамма $U1$, отличающийся от последнего двумя заменами в белке оболочке) подтвердили эти соображения.

Похоже, что подобные каналы ранее наблюдались в работе Неймана с соавторами [14] при исследовании ими структуры фага MS2. Фаговые частицы представляют собой сферы, внешняя оболочка, которых – капсид толщиной ~40 нм образована белковыми субъединицами, а внутренняя полость содержит молекулу РНК. Бомбардировка атомами трития не сопровождалась нарушениями структуры фаговых частиц и потерей инфекционности даже при весьма высоком уровне включения метки – удельная активность составляла 20–50 Ки/ммоль. Анализ

распределения трития между белковой компонентой и фаговой РНК показал сравнительно высокую доступность последней мечению: отношение метки белок/РНК составляло 3:1. Это позволило авторам сделать вывод об ажурности внешнего белкового капсида, наличии между субъединицами каналов, размеры которых достаточны для проникновения во внутреннюю сферу атомов трития.

Сопоставление полученной информации о поверхности вириона ВТМ с известной картой антигенных детерминант белка оболочки в составе вируса позволило говорить о еще одном важном аспекте приложения метода тритиевой планиграфии, имеющем отношение к иммунохимическим исследованиям. Антигенные детерминанты белка в составе ВТМ представлены тремя участками белка. Это 1–10 остатки пептида Т1, 62–68 остатки пептида Т4 и 153–158 остатки пептида Т12 [19]. Являясь антигенными детерминантами, все эти участки поверхностно локализованы и все содержат, как было показано, тритиевую метку.

Таким образом, определение доступной для включения трития части поверхности объекта может существенно облегчить работу по выяснению его детальной антигенной характеристики, сужая круг поиска пептидов-претендентов на роль антигенных детерминант. Это представляется принципиально важным, поскольку подобная задача является весьма сложной и многотрудной.

4.4. Топография доступной поверхности вируса X картофеля.

Модель пространственной укладки белка оболочки в вирусе

Результаты, полученные на ВТМ, стимулировали работу с вирусом X картофеля (ХВК), одним из наиболее распространенных представителей группы потексвирусов, поражающих растения картофеля и наносящих огромный ущерб картофельному хозяйству. Хотя история его изучения не менее продолжительна, чем ВТМ, информация о его структуре и прежде всего о конформации субъединиц белка оболочки и их упаковке в вирионе была существенно более ограничена. Данные РСА с низким разрешением позволяли выявить лишь некоторые морфологические

Таблица 4.1

Общая характеристика строения вирионов ВТМ и ХВК

Вирус	Длина, Å	Диаметр, Å	Канал (радиус, Å)	Число субъединиц на виток	Число субъединиц в вирионе	Мол. масса белка, кДа	Число остатков в белке	Шаг витка спирали, Å
ВТМ	3000	180	20	16 и 1/3	2130	17.5	158	23
ХВК	5150	130	10	8 и 7/8	1306	25.0	236	35

особенности вириона, оценить длину вирусной РНК и число белковых субъединиц в составе вириона.

ХВК, как и ВТМ, имеет форму гибкого стержня, но большей длины и уже диаметром (см. табл. 4.1).

Как и в ВТМ, вирусная РНК расположена внутри вириона, а капсид вириона образован идентичными субъединицами белка из 236 аминокислот [13]. Данные о поверхности вирионов потексвирусов к моменту начала работ были весьма немногочисленны и до некоторой степени противоречивы. Биохимические и иммунологические исследования ряда авторов свидетельствовали о локализации на внешней поверхности вирионов только N-концевой части белка оболочки [16, 52, 71, 77, 88]. По другим данным, поверхностно экспонированными были и N-, и С-концевые части белка [53, 54, 73]. На основе предсказания элементов вторичной структуры для белка оболочки X-вируса картофеля Сауером была выявлена некоторая общность формирования вторичной структуры белков оболочки вирионов ХВК и ВТМ [73], включая четыре α -спиральных участка (рис. 4.17). Позже, после изучения продуктов мягкого протеолиза трипсином шести штаммов потивирусов, когда было показано, что и N-, и С-концевые области белков оболочки экспонированы на поверхности вирусных частиц, и описано влияние удаления 30–67 (в зависимости от штамма вируса) N-концевых аминокислот и 18–20 С-концевых аминокислот на инфекционность и серологические свойства вирусов, Шукла сформулировал гипотезу о общности сворачивания полипептидной цепи белка для всех стержнеобразных растительных вирусов с поверхностной локализацией их N- и С-концевых частей в вирионах [75].

Известно, что в процессе выделения и хранения препаратов X-вируса картофеля может происходить протеолитическое расщепление вирусного белка оболочки [41, 80], что является, ве-

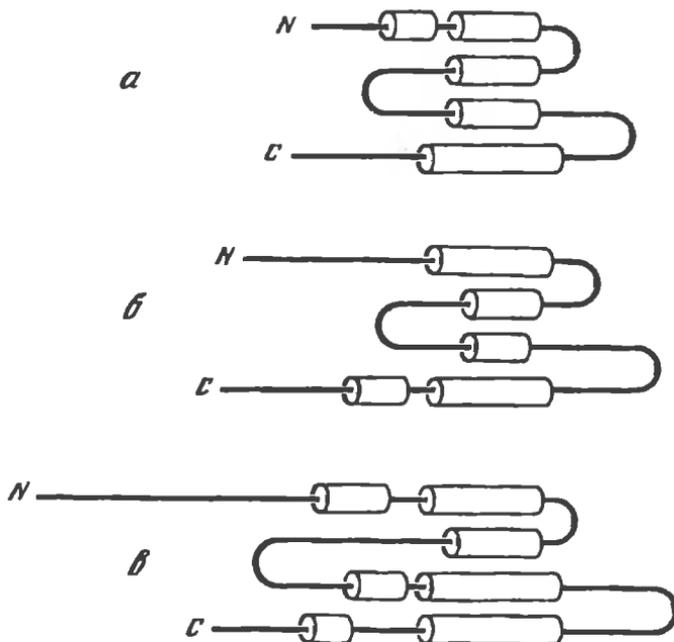


Рис. 4.17. Схематическое представление элементов вторичных структур белков оболочки, демонстрирующее расположение α -спиралей (обозначены цилиндрами) вдоль цепи белка

а – ВТМ (из данных [30]), *б* – X-вируса картофеля [73] и *в* – Y-вируса картофеля [65]

роятно, результатом действия примесей растительных протеаз, присутствующих даже в хорошо очищенных препаратах вируса. В результате образуется ряд дискретных форм белка оболочки с убывающей молекулярной массой. В наибольших количествах обычно обнаруживаются интактная форма белка оболочки (236 аминокислотных остатков, обозначаемая как P_2 в терминологии Кениг и Торранс [52], и форма этого белка, утратившая примерно 20 остатков с N-конца (P_1 -форма). На представленной ниже N-концевой последовательности белка оболочки стрелками обозначены места расщепления русского штамма X-вируса картофеля, инкубированного в растительном соке при 4°C в течение 7–10 дней:



Путем инкубации вируса в экстрактах из зараженных растений в течение нескольких дней иногда удается получить препараты X-вируса картофеля, содержащие только P_1 -форму белка

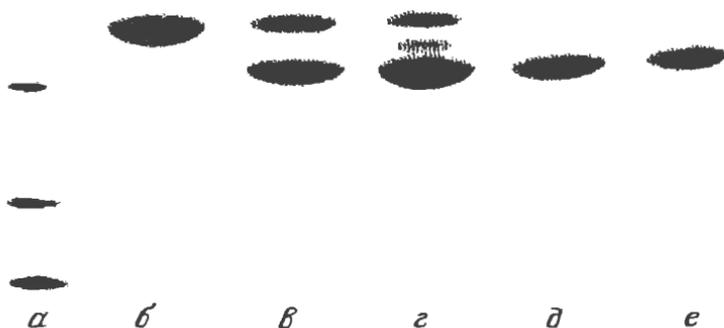


Рис. 4.18. Электрофорез белков оболочки X-вируса картофеля в градиентном (7.5-20%) SDS-полиакриламидном геле [2]

а) белки-маркеры; *б)* – препарат вируса, содержащий только P_5 -форму белка; *в)* и *г)* – препараты вируса, содержащие P_5 - и P_7 -формы белка; *д)* и *е)* – препараты вируса, содержащие только P_7 -форму белка. Белки-маркеры: сывороточный альбумин (67 кД), овальбумин (45 кД), белок оболочки вируса штриховатой мозаики ячменя (23 кД), белок оболочки вируса табачной мозаики (17.5 кД) и цитохром с (12.3 кД)

оболочки (рис. 4.18). Таким самым естественным образом складывалась ситуация, когда имея в руках интактный белок вируса и белок, укороченный на 20 аминокислот, можно было попытаться разрешить многолетние разногласия о локализации N- и C-концевых последовательностей белка оболочки в вирионе.

Для изучения топографии доступной поверхности вируса X картофеля мечению потоком атомов трития подвергались интактные вирусные частицы, содержащие оболочки с молекулярной массой 26 кДа, а также вирионы с укороченным белком оболочки (22 кДа) (рис. 4.18). До облучения препараты вирионов охарактеризовали по белку (электрофорезом в геле, N- и C-концевым анализом и сравнением их триптических пептидов).

Для получения фрагментов меченого белка были использованы два фермента: трипсин и *S. aureus* протеаза V8 (рис. 4.19). При сравнении профилей доступности атомам трития аминокис-

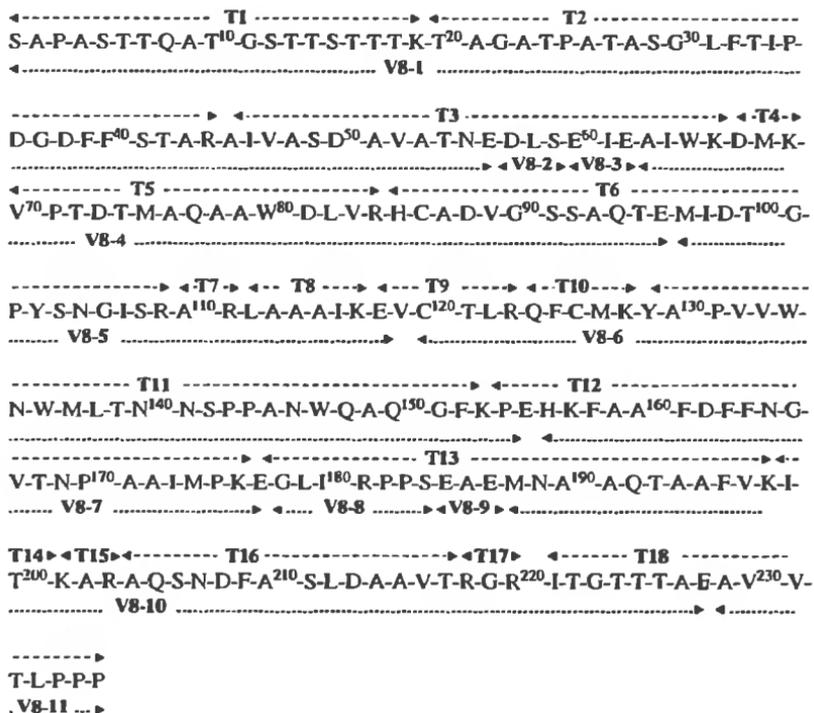


Рис. 4.19. Аминокислотная последовательность белка оболочки X-вируса картофеля согласно [13]

(---) – T1-T18, триптические пептиды белка; (...) – V8-1–V8-11, *St. aureus* V8 пептиды белка. Лизин₁₉ принимает участие в формировании антигенной детерминанты X-вируса картофеля. В аминокислотную последовательность белка внесены коррективы в положениях 46 и 64

лотных остатков белка оболочки ХВК из интактных вирионов (рис. 4.20, а) и белка оболочки ВТМ (см. рис. 4.12) бросается в глаза их резкое отличие. Прежде всего это отсутствие резких границ между доступными и недоступными для атомов трития участками, что указывает на более "рыхлую" структуру вирионов ХВК по сравнению с ВТМ (см. табл. 4.1).

Резко отличается и распределение метки в белке оболочки из интактных вирусных частиц и *in situ* частично деградированных вирионов (без 19-членного пептида T1). В интактном вирионе на первые N-концевые 19 аминокислот белка оболочки приходится ~ 62% от суммарной метки, включенной в белок, что говорит о поверхностной экспонированности этого участка. Практически недоступен для введения метки С-концевой участок белка. Ос-

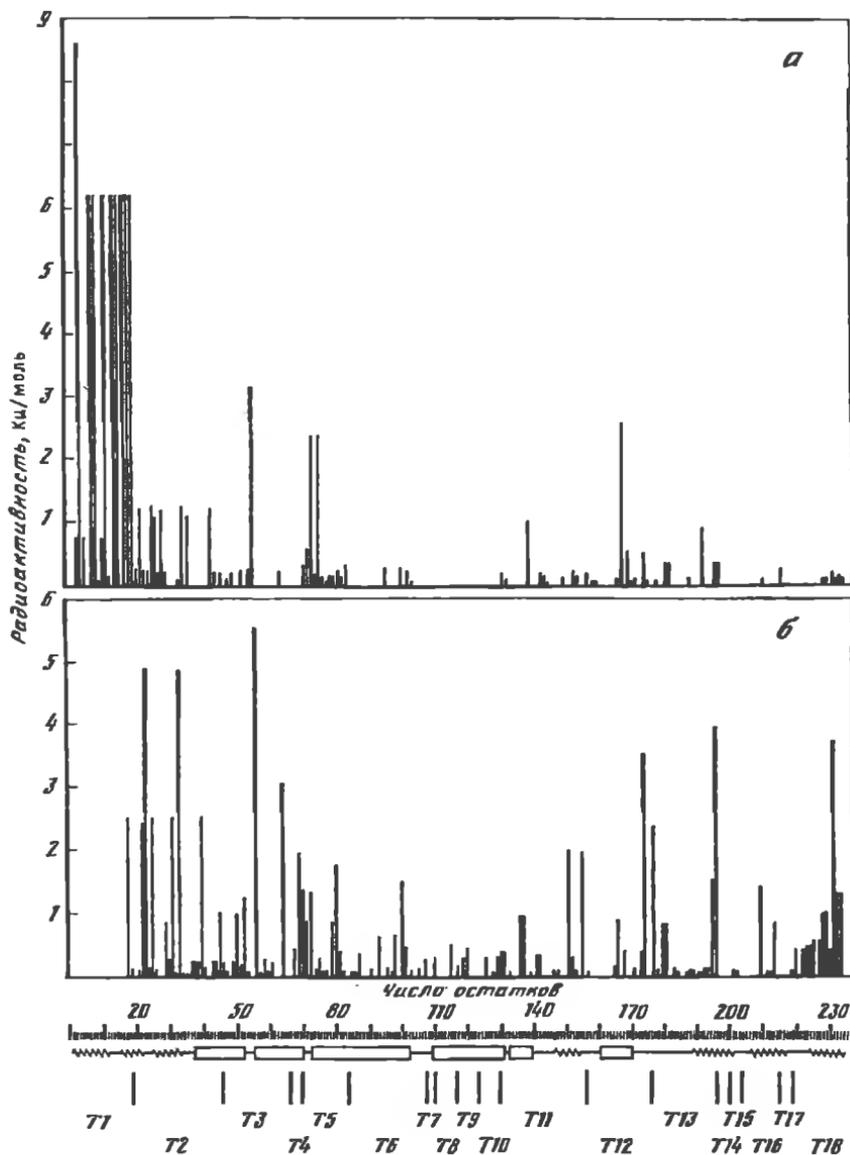


Рис. 4.20. Внутримолекулярное распределение метки в белке оболочки ХВК

а – в интактных вирионах и *б* – в частично *in situ* деградированных (без 19-членного пептида T1) протеазами клеточного сока. По оси ординат отложена удельная активность i-аминокислотного остатка, отнесенная к сумме удельных активностей всех аминокислот белка (в %)

татки 204–236 включают всего ~ 2.3% от суммарной радиоактивности белка. При отщеплении первых 19 аминокислот (в препаратах *in situ* частично деградированного белка) доступность С-концевого участка для введения метки резко возрастает. Те же 204–236 аминокислотные остатки содержат в этом случае уже ~ 17.5% суммарной радиоактивной метки.

Эти результаты полностью подтвердили данные картирования поверхности интактных вирионов моноклональными антителами, в соответствии с которыми только N-концевой пептид экспонирован на поверхности вириона и образует высоко иммуногенную антигенную детерминанту [77], и позволили локализовать С-концевой фрагмент в вирионе, который экранируется N-концевым участком белка, "обнажаясь" при отщеплении последнего для потока атомов трития. Естественно, нельзя утверждать, что отщепление этих 19 аминокислот абсолютно ничего не изменило в пространственной структуре белка. Однако эксперименты Гольдштейн и др. [5] позволяют говорить, что эти изменения незначительны, о чем свидетельствовали сравнения антигенных свойств X-вируса картофеля и его белка оболочки и изучение влияния протеолитического расщепления белка оболочки на его способность к реконструкции с РНК и на инфекционность вируса.

Для построения модели укладки белка оболочки ХВК в интактном вирионе наряду с экспериментальными данными о топографии поверхности белка были использованы также и теоретические предсказания элементов вторичной структуры. По алгоритму Лима [60] предсказываются как α -спиральные шесть участков: 37–52, 55–70, 72–102, 109–131, 132–139 и 160–170. Две α -спиральные области 55–70 и 72–102 образуют супервторичную структуру, так называемый α - α -уголок. Эти две α -спиральные области связаны перетяжкой и упакованы крестообразно. В данной структуре, как и практически во всех подобных структурах, в последовательности 55–102 белка наблюдается строго определенное расположение гидрофобных и гидрофильных аминокислот и остатков глицина. Обнаруженный в структуре белка оболочки вируса α - α -уголок резко сократил число возможных упаковок остальных α -спиралей, облегчив моделирование пространственной структуры (рис. 4.21).

В белке предсказывается также протяженная β -структурная область, включающая остатки 1–12, 14–22, 24–33, 145–153, 187–

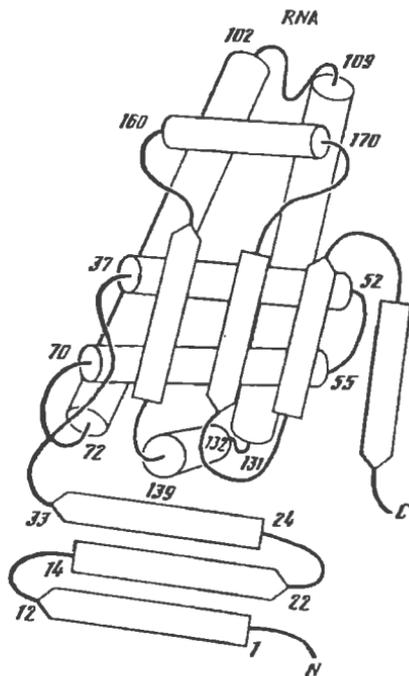


Рис. 4.21. Модель укладки белка оболочки ХВК

α -спирали представлены цилиндрами, β -тяжи – плоскими стрелками. Буквами N и C обозначены N- и C-концевые аминокислоты белка. Положения некоторых аминокислотных остатков пронумерованы

200, 205–217 и 222–234. Последовательные β -тяжи 1–12, 14–22 и 24–33, соединенные перетяжками, образуют β -слой, который как бы "прикрывает" молекулу белка, образуя внешнюю поверхность частицы ХВК. Другой β -слой, образованный β -тяжами 145–153, 187–200, 205–217 и 222–234, располагается на α -спиральном слое и спрятан в вирусной частице.

Эта модель пространственной структуры белка оболочки ХВК, полученная на основании экспериментальных данных методом тритиевой планиграфии и теоретических предсказаний элементов вторичной структуры, дает также разумное структурное объяснение факту, полученному разными группами с помощью моноклонального картирования, свидетельствующему, что N-конец белка оболочки образует вирусспецифическую антигенную детерминанту, локализованную на поверхности вириона. Можно видеть, что на модели укладки белка в вирионе эта N-концевая β -структурная область, образующая β -слой, поверхностно локализована. Хорошо описываются в рамках модели и данные о доступности N-концевых остатков протеазам клеточного сока.

Таким образом, полученные с помощью тритиевой планиграфии данные существенно дополнили знания о структуре вириона X-вируса картофеля и позволили поставить "точку" в многолетних дебатах о локализации C-концевого фрагмента белка оболочки в составе вириона.

4.5. Изучение структурной организации вируса гриппа

Оболочечные вирусы составляют особый обширный класс, к которому относятся большинство патогенных вирусов животных и человека. Они отличаются от рассмотренных выше ВТМ и ХВК существенно более сложной пространственной структурой, включающей липидную мембрану, поверхностные и внутренние белки, нуклеиновую кислоту. Весьма сложен и многообразен и механизм их функционирования, включающий этапы проникновения в клетку, репродукцию и др., каждый из которых сопряжен с определенными изменениями конформации и структуры как целого вириона, так и отдельных его компонентов.

Типичным представителем оболочечных вирусов является вирус гриппа, принадлежащий к семейству ортомиксовирусов, образованному вирусами трех типов: А, В и С. К настоящему времени накоплен обширный материал о молекулярной организации вириона вируса гриппа (обзоры [59, 78, 95, 97]).

Вирус гриппа содержит четыре основных структурных белка. Их локализация и функции в вирионе различны. Два поверхностных гликопротеида – гемагглютинин (НА, ~ 500 копий на вирион) и нейраминидаза (НА₂, ~ 100 копий на вирион) – ассоциированы с липидной оболочкой и формируют шипы на поверхности вириона. Геномная вирусная РНК (восемь отдельных сегментов) в комплексе с нуклеобелком (NP, ~ 1000 копий на вирион) и тремя минорными белками полимеразного комплекса формирует вирусный нуклеопротеид (РНП).

Около 40% всей белковой массы в вирионе приходится на М1 белок (~ 3000 копий в вирионе). Матриксный М1 белок формирует слой, лежащий под липидной мембраной вириона, частично интегрированный во внутренний лист бислоя, и взаимодействует с РНП и мембраной.

Согласно общепринятой модели поверхностный гликопротеид гемагглютинин (НА) обеспечивает адсорбцию вируса на рецепторах клеточной поверхности и последующее слияние липидных мембран клетки и вириона, необходимое для внутриклеточного высвобождения вирусного рибонуклеопротеида (РНП). Важную роль в этом слиянии играет кислая реакция среды в эндосоме, приводящая к конформационной перестройке НА. В составе РНП вирусная РНК переносится в ядро клетки, где транскриби-

руется с образованием вирусных мРНК. Роль матриксного белка М1 как на этапе слияния мембран, так и на этапе внутриядерного транспорта и функционирования вирусного РНП остается пока неясной, хотя косвенные данные указывают на то, что белок М1 может участвовать в обоих процессах. К сожалению, вирусы гриппа не образуют кристаллов и детальное знание о молекулярной организации вириона ограничивается данными РСА для растворимого эктодомена НА, освобождаемого при гидролизе НА с поверхности вирионов бромелаином (ВНА) при нейтральном и кислом рН [34, 98], нейраминидазы [90], кристаллической структуры НА в комплексе с высокоаффинными аналогами рецептора [94], а также данными РСА для комплекса антигенсвязывающего фрагмента нейтрализующего антитела (Fab) с мембран дистальным фрагментом субъединицы НА [27] и кристаллической структурой 1–73 фрагмента (РНКсвязывающего домена) неструктурного белка NS1 вируса гриппа А [61]. Каким образом структурные белки ориентированы в вирионе и посредством каких сайтов они регулируют свой внутриклеточный маршрут, взаимодействуя с определенными клеточными структурами, определяют узнавание вирусных макромолекул, необходимое для сборки зрелых вирусных частиц, вопросы детальной антигенной характеристики поверхности вирусного капсида и многие другие – все это до настоящего времени открытые вопросы.

Ключевым событием в проникновении многих оболочечных вирусов в клетку является слияние вирусной и эндосомальной мембран, для чего они используют специальные белки [78]. Среди этих вирусных сливающихся белков гемагглютинин (НА), основной гликобелок на поверхности вируса гриппа, наиболее структурно и биохимически охарактеризован [96]. При определенном значении рН, несколько варьируемом в зависимости от штамма вируса, происходит конформационная перестройка белка слияния, инициирующая слияние мембран [96]. Молекулярный механизм такого слияния липидных бислоев все еще не ясен, несмотря на ряд исследований биохимического, биофизического, молекулярно-генетического и иммунологического характера [49]. Одна из причин – отсутствие экспериментальной модели, позволяющей изучать различные стадии структурной реорганизации сливающихся белков в процессе слияния мембран.

4.5.1. Модель для изучения структурной реорганизации сливающихся белков, иницируемой кислым рН

Данные рентгеноструктурного анализа для ВНА при нейтральном и кислом рН прояснили в общих чертах перестройку вторичной и третичной структуры гемагглютининовых шипов, происходящую при кислотной трансформации вирионов. При этом, пожалуй, наиболее ярким был факт, состоящий в том, что N-концевая часть малой субъединицы НА (НА₂), так называемый пептид слияния, спрятан внутри гомотримерной глобулярной структуры НА [98] при нейтральном рН. При рН слияния этот пептид становится экспонированным и может быть встроен в бислой мембраны-мишени [79].

Так как рН-зависимый конформационный переход сопряжен с изменением экспонированности фрагментов полипептидной цепи, то для его изучения представлялось весьма перспективным применить метод тритиевой планиграфии. Однако прямое сравнение результатов бомбардировки атомарным тритием нативных и трансформированных кислым рН вирионов вируса гриппа было неправомерным, поскольку в этом случае исследовались бы два разных, по сути, объекта: в отсутствие мембраны-мишени процесс конформационных перестроек НА, происходящий при обработке вирионов кислым рН, не ограничивается белком НА. Гидрофобизация поверхности белка в результате такой трансформации должна приводить к дальнейшим структурным изменениям поверхности всего вириона и, как результат, к агрегации вирионов друг с другом с образованием так называемых розеток.

Для изучения молекулярных механизмов мембран белковых взаимодействий и была предложена экспериментальная модель, которая, как и всякая модель, была куда более простой, нежели реальная ситуация, но тем не менее адекватно имитировала события, происходящие в эндосоме клеток [43]. В модели, состоящей из больших моноламеллярных липосом, способных выравнивать трансмембранный градиент протонов за счет встроенного в их бислой ионофора нигерицина, белок, находящийся внутри липомом, претерпевает структурные изменения после закисления среды и взаимодействует с мембраной липосом "изнутри". Тритиевая бомбардировка внешней поверхности контрольных (рН 7.2) и опытных (рН 5.0) липосом и последующий анализ распределения метки в белке позволяют визуализовать характер взаимодействия белка с липидным бислоем, а также выявить кон-

кретные участки белка, участвующие в этом процессе. В качестве белка, взаимодействующего с липидным бислоем, были использованы ВНА (эктодомены вирусных шипов). При этом важно было выбрать такую концентрацию белка в липосоме, чтобы все белки взаимодействовали с мембраной, а не агрегировали внутри везикулы. Оптимально – это один-два эктодомена внутри одной липосомы. Закисление внешней среды до pH 5.0 и осуществляемое нигерицином закисление внутреннего содержимого липосом приводило к конформационной перестройке ВНА внутри липосом, т.е. к переводу белка в активное состояние.

При сравнении значений удельной радиоактивности ВНА из контрольных и опытных липосом были отмечены ббльшая (~ в 2 раза) доступность атомам трития ВНА в опытных липосомах по сравнению с контрольными и различие в распределении метки по отдельным аминокислотам. Так, относительное включение метки в аминокислоты изолейцин, тирозин и фенилаланин в 2–3 раза выше для ВНА из опытных липосом. Можно полагать, что двукратное увеличение активности ВНА из опытных липосом связано с взаимодействием и проникновением вглубь мембраны всей или значительной части макромолекулы ВНА и тем самым приближением ее к "внешней" поверхности бислоя. Липидный бислой липосом для трития частично проницаем, чем и объясняется включение трития в ВНА в контрольных липосомах. Сравнение включения метки в свободный ВНА и в ВНА из контрольных липосом показывает, что прохождение липидной мембраны (толщина ~ 50 Å) уменьшает поток горячих атомов трития в ~ 10 раз.

Большая удельная метка таких аминокислот, как изолейцин, тирозин и фенилаланин, безусловно, говорит о гидрофобизации поверхности ВНА в опытных липосомах. Принадлежат ли эти меченые гидрофобные аминокислоты только N-концевой части НА2 или же это отражает суммарный эффект включения метки в ставшие экспонированными в результате конформационной перестройки ВНА другие части молекулы белка, сказать трудно. Можно предположить, что ослабление потока горячих атомов трития при прохождении фосфолипидной мембраны описывается простым экспоненциальным законом

$$I = I_0 e^{-kx},$$

где I_0 и I – потоки горячих атомов трития на поверхности

липосомы и на глубине x , k – коэффициент ослабления, зависящий от плотности среды (мембраны) и сечения процессов, приводящих к ослаблению потока.

Величина k – в свою очередь может быть определена из сравнения включения метки в свободный белок ВНА и белок внутри липосомы (контроль) и для мембраны толщиной 50 \AA составляет $0.046 \times 10^{-8} \text{ см}^{-1}$. Следовательно, увеличение доступности ВНА при изменении pH соответствует его перемещению к поверхности липосомы на $\sim 15 \text{ \AA}$, т.е. примерно на треть толщины бислоя. Это, естественно, средняя величина. Отдельные фрагменты полипептидной цепи могут интегрироваться в мембрану на значительно большую глубину, в то время как часть белковой глобулы по-прежнему остается на внутренней стороне мембраны.

4.5.2. Изучение топографии поверхности матричного M1 белка в составе вируса

Исключительная функциональная значимость матричного M1 белка в поддержании структуры вириона, репликации вируса, его функции в зараженных клетках сделали его объектом детального изучения. Накоплена информация по антигенному [50] и функциональному картированию белка [7, 33, 46, 93, 101, 102], его внутриклеточной локализации [7, 64]. Недавно получены первые данные РСА для фрагмента (остатки 2–158) свободного M1 белка [74].

Согласно данным криоэлектронной микроскопии, в вирионе вируса гриппа А M1 белок проникает лишь во внутренний лист бислоя мембраны и, следовательно, не имеет в составе вириона поверхностно экспонированных участков [42]. О том, что M1 белок погружен в липидную мембрану вируса, говорят и эксперименты по реакции вирионов с липофильными агентами [44]. На модельных опытах с липосомами были идентифицированы три гидрофобных домена белка, которыми он встраивался в их бислой. Это были участки белка 9–21, 58–72 и 114–153 [45]. Отдельные же публикации о том, что моноклональные антитела к M1 белку детектируют эпитопы белка на поверхности вириона, считались, в общем-то, артефактами [50].

Метод тритиевой планиграфии позволил получить важную информацию о локализации белка M1 в составе вириона и предложить модель укладки полипептидной цепи в мембране вируса.

Облучению атомарным тритием подвергали свежеприготовленную суспензию вирусных частиц. Для исключения разрушения вирусных частиц в результате кристаллизации воды при замораживании использовали технику быстрого охлаждения, при которой суспензия замерзает в форме стекла. Для выделения вирусных частиц из меченой мишени использовали метод центрифугирования, включающий лишь одно мягкое осаждение через слой сахарозы на изотоническом солевом растворе с рН 7.6, обеспечивающее выделение неразрушенных и неагрегированных частиц. Проверка сохранения интактности вирусных частиц в ходе приготовления мишени и проведения облучения потребовала ряда контрольных экспериментов [9, 10, 43].

Как было показано, процедуры подготовки мишени для введения метки выдерживают такие структуры, как искусственные большие мономеллярные липосомы из смеси фосфатидилхолина и холестерина и маленькие лецитиновые липосомы, нагруженные флюорофором кальцеином и ^{14}C -лизином. О сохранении целостности вирусных частиц свидетельствуют и результаты электронно-микроскопического тестирования на проникновение красителя внутрь вирионов после их облучения.

Меченые вирусные препараты были охарактеризованы также седиментацией в градиенте плотности сахарозы с полным раскапыванием градиента и анализом фракций ДСН-электрофорезом. Препараты меченных тритием вирусных частиц сохраняли свою биологическую активность (инфекционность и гемагглютинирующую активность).

Относительная доступность для включения атомов трития в основные белки вируса гриппа: гемагглютинин (НА), матриксный белок М1 (М1) и внутренний белок нуклеокапсида (NP) может быть определена прямым просчетом гелей.

Как видно на рис. 4.22, основная часть метки включена в белки НА и М1. Слабая радиоактивная метка наблюдалась и в зоне элюции NP и NA белков и, по всей видимости, обусловлена включением трития в белок NA. Последний, как и НА, является гликопротеидом и локализован на поверхности вириона, однако содержится в количестве всего ~ 5% от суммы всех белков.

Если высокое включение метки в гемагглютинин вполне согласуется с известными данными о его локализации на поверхности вириона, то доступность белка М1 требует объяснения. Сохранение интактности вирионов, контрольные эксперименты с

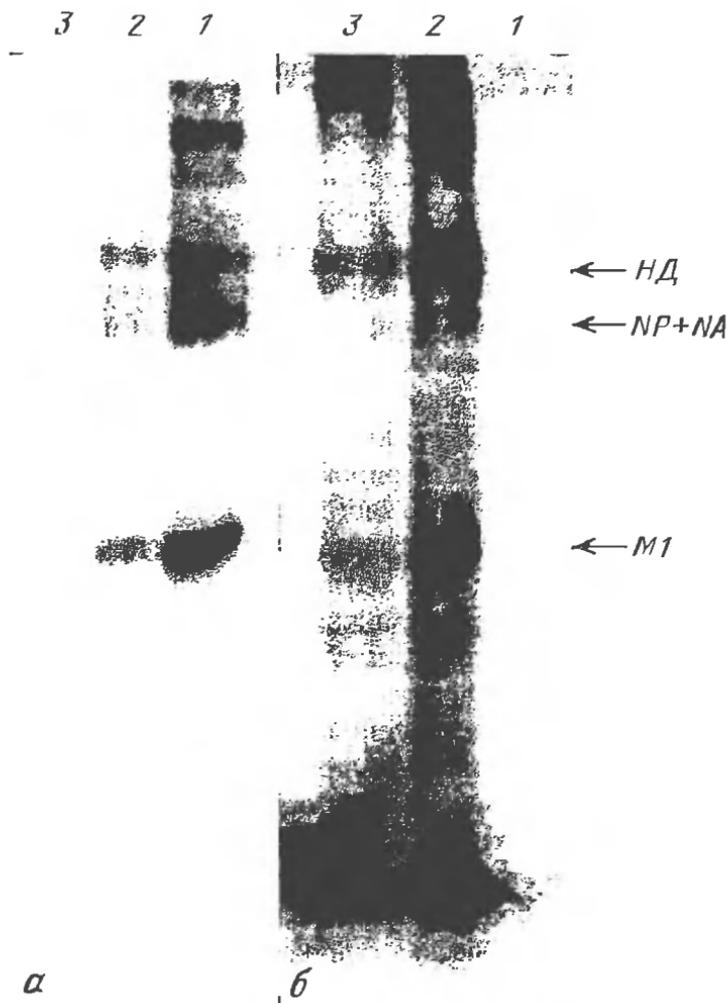


Рис. 4.22. Электрофоретический анализ белков из меченого тритием вируса гриппа штамм A/Aichi/2/68 (H3N2) по Лэммли [55]

а – гель прокрашен Кумасси R-250; *б* – радиоавтограф геля. 1 – белки из исходного препарата вируса; 2 – белки из меченого препарата вируса; 3 – белки вирусного нуклеоида после удаления поверхностных белков из меченого препарата вируса

большими и малыми липосомами свидетельствуют о том, что целостность вирусной частицы не нарушается при замораживании образца, и проникновение атомов трития в результате растрескивания мембраны можно исключить. Аминокислотный анализ белка M1 показал, что метка в самом деле включается в белковый компонент, а не связана с неполным удалением липидов или присоединением трития к неопределённым жирным кислотам, ацилирующим белок.

К сожалению, прямое сопоставление радиоактивностей гем-агглютинина и белка М1 затруднено тем, что первый гликозилирован. Вероятность включения метки в гликозидные группы существенно меньше, чем в углеводородные группы остатков аминокислот, и точное определение экспонированности НА и соответственно оценка доступности полипептидной цепи М1 затруднены. Более однозначные выводы о локализации М1 в составе вириона могли бы быть получены из сравнения включения метки в белок в составе вириона и в свободном состоянии в растворе, но при этом необходимо быть уверенным в тождественности их структур в обоих состояниях. На сегодня вопрос о том, имеет ли белок М1 участки, экспонированные на поверхности, или полностью интегрирован в мембрану, остается открытым и требует дополнительного исследования.

Независимый интерес представляет исследование внутри-молекулярного распределения метки в полипептидной цепи белка М1, на основании которого можно предложить модель пространственной структуры белка и топологию укладки его элементов в составе вириона.

Для решения такой задачи необходимо провести фрагментацию белка на пептиды и определить включение метки в индивидуальные аминокислотные остатки, составляющие эти пептиды. Для М1 белка, однако, прямой подход оказался невозможен. М1 белок – это достаточно крупный (252 аминокислоты) белок, содержащий большое число кластеров гидрофобных аминокислот (рис. 4.23). Высокая гидрофобность белка затрудняла его растворение в воде и проведение гидролиза обычными протеолитическими ферментами даже при выделении его из вирионов, специальным образом обработанных неионным детергентом при слабокислом рН (рис. 4.24) [105]. Заметим, что с подобными трудностями сопряжен анализ всех мембранных белков. Для М1 белка была использована специальная техника анализа, заключающаяся в иммобилизации его на нерастворимом активированном носителе (Thiopropyl Sepharose 6B) посредством тиол-дисульфидного обмена по методу Егорова [39]. В такой форме белок становится чувствительным к гидролизу трипсином, что делает возможным его фрагментацию и селективное выделение цистеинсодержащих (рис. 4.25) и цистеиннесодержащих пептидов (рис. 4.26). С помощью высокоэффективной хроматографии было выделено 24 индивидуальных пептида [40]. Полученное в ре-



Рис. 4.23. Аминокислотная последовательность М1 белка из A/Aichi/2/68 (H3N2) штамма вируса гриппа согласно [100]

Триптические пептиды М1 белка обозначены как Т1–Т24

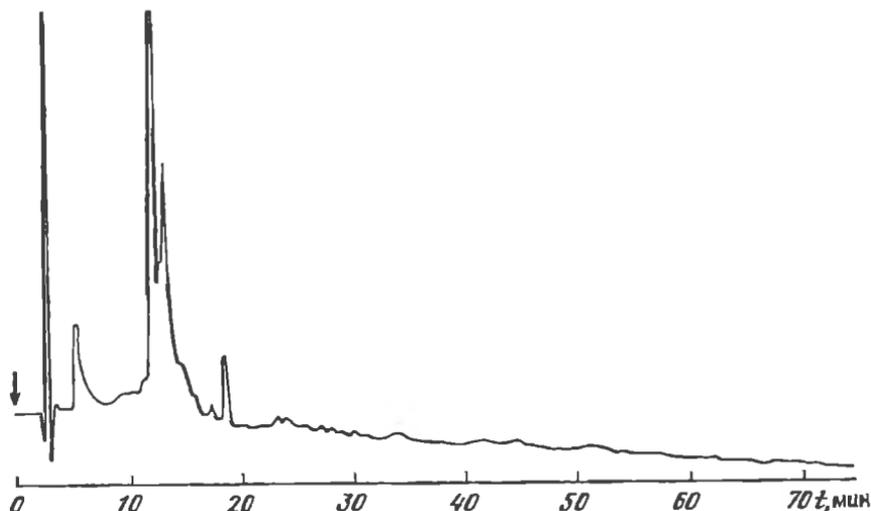


Рис. 4.24. Высокоэффективная жидкостная хроматография в обращенной фазе продуктов триптического гидролиза М1 белка

Колонка: Ultrashpere ODS (5 мкм) из фирмы "Бекман", 250 × 4.6 мм; условия элюции: первые 3 мин 0.1%-ная трифторуксусная кислота в воде, затем линейный градиент до 50%-ного ацетонитрила за 60 мин и затем до 60%-ного ацетонитрила за 10 мин; детекция при 215 нм

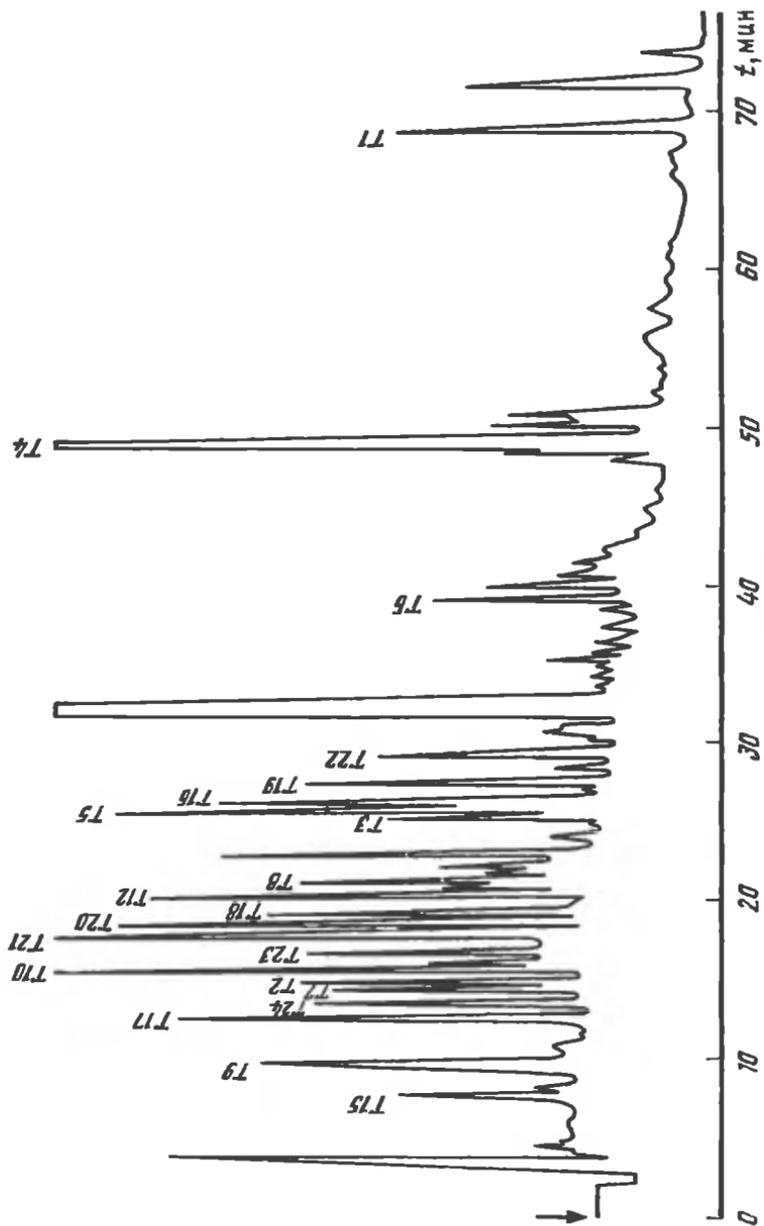


Рис. 4.25. Разделение триглицерических цистеиннесодержащих пептидов M1 белка, иммобилизованного на активированной тиопропил Сефарозе-6В

Условия разделения те же, что и на рис. 4.24

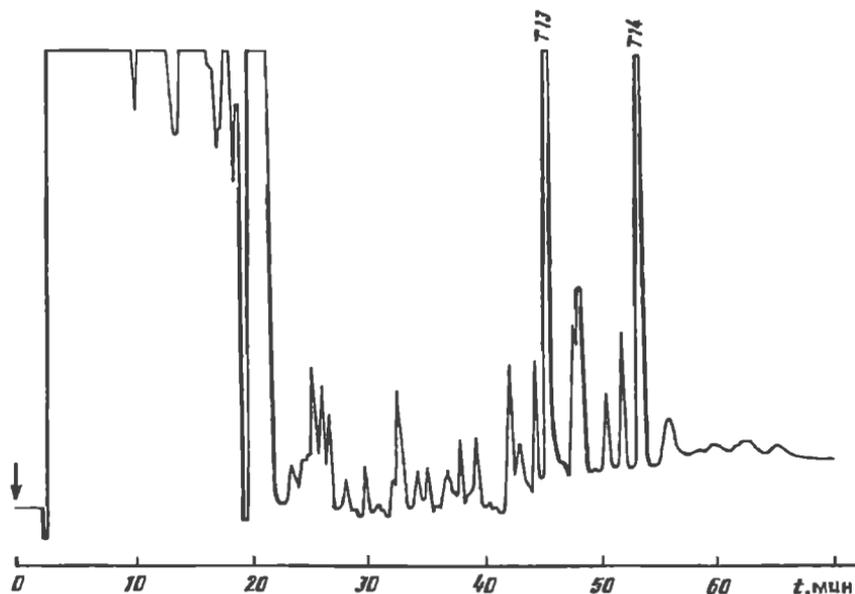


Рис. 4.26. Разделение триптических цистеинсодержащих пептидов М1 белка, иммобилизованного на активированной тиопропил Сефарозе-6В
Условия разделения те же, что и на рис. 4.24

в результате анализа распределение метки по пептидам белка приведено на рис. 4.27. Если принять доступность пептида Т16, средняя удельная радиоактивность остатков в котором максимальна за единицу, то остальные пептиды расположатся в ряд по степени их экспонированности: Т16(1.0) > Т8(0.73) > Т3(0.68) > Т9(0.64) > > Т12(0.63) > Т21(0.61) > Т10(0.59) > Т20(0.57) > Т5(0.54) > > Т18(0.45) > Т2(0.36) > Т7(0.35) > Т6(0.30) > Т22(0.26) > > Т19(0.21) > Т4, Т15(0.20) > Т14(0.17) > Т13(0.10) > Т1(0.04). В дальнейшем при построении модели к доступным были отнесены все пептиды с относительной экспонированностью 0.45 и выше.

Согласно данным РСА, для кристаллической формы фрагмента (остатки 2–158) М1 белок содержит 9 α -спиралей (Н1–Н9), 8 петлеобразных областей (L1–L8) и не содержит β -цепей [74]. Пучок спиралей Н1–Н4 формирует первый, N-концевой (N) домен (остатки 2–67), а спирали Н6–Н9 второй, центральный (M) домен (остатки 91–158). Остатки 164–252, как полагают авторы работы, должны образовать, как минимум, C-концевой (C) домен. Если принять, что α -спиральные участки в кристаллической структуре фрагмента сохраняются и в белке, когда он находится

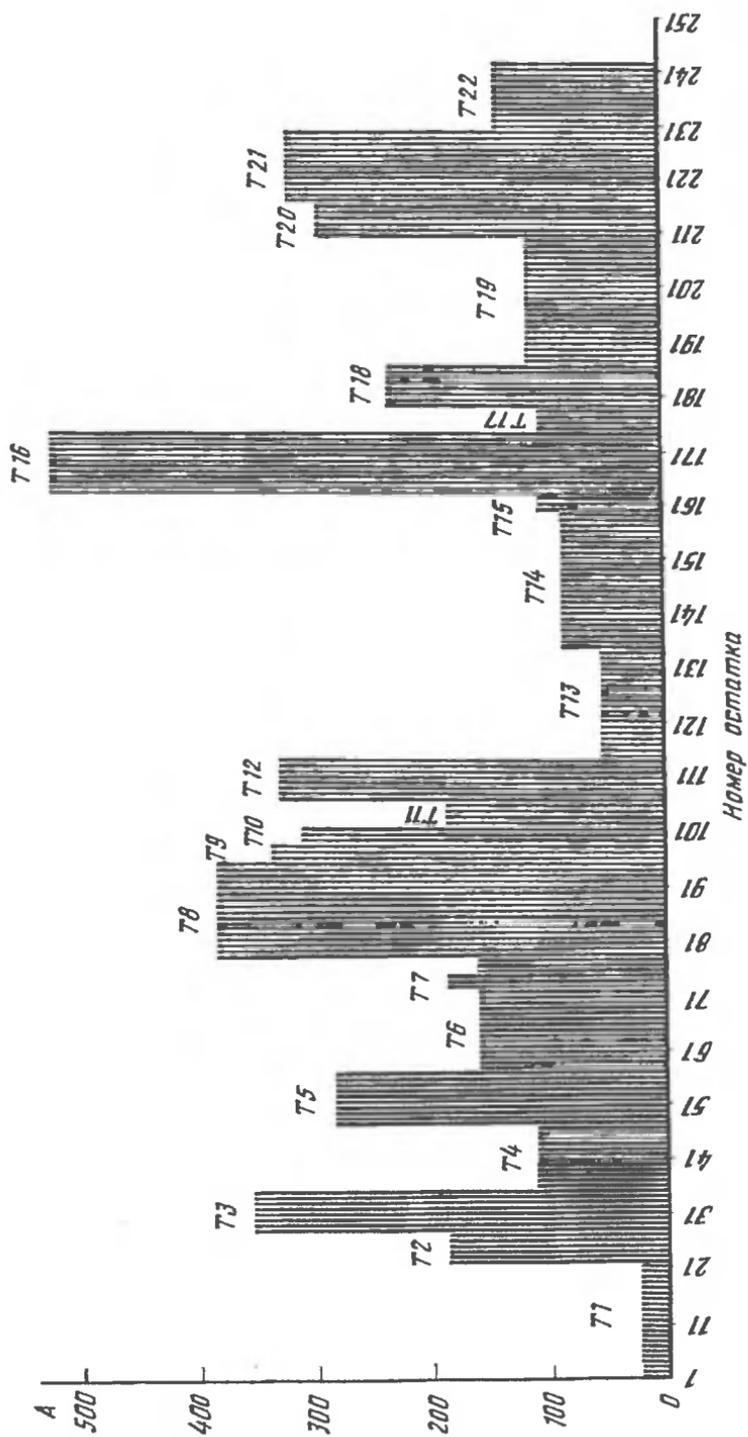


Рис. 4.27. Внутримолекулярное распределение метки по триптическим пептидам белка М1, выделенного из меченого вируса гриппа А/Аichi/2/68

А — удельная радиоактивность аминокислоты в пептиде, в мКи $\times 10^{-6}$ /нмоль/число остатков

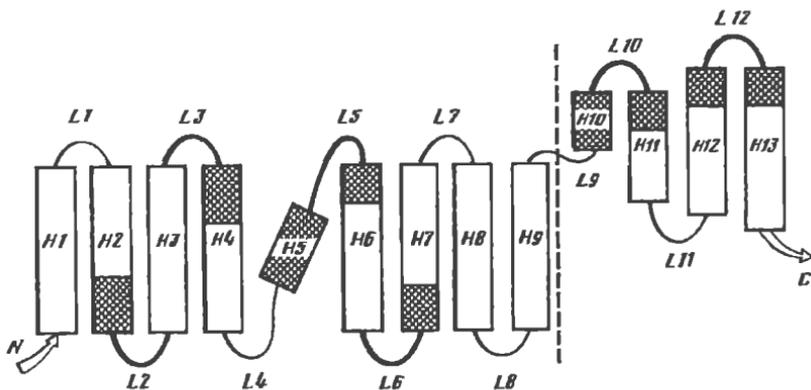


Рис. 4.28. Типология M1 белка с отмеченными участками включения метки

Топология фрагмента белка от остатка 2 до 158 (спирали H1–H9 и соединяющие их петли L1–L8; левая сторона рисунка) взята из работы [74]. Топология С-концевого фрагмента (спирали H10–H13 и соединяющие их петли L9–L12; правая сторона рисунка) была предсказана по алгоритму Лима [60]

в составе вируса, то при нанесении на карту топологии 9 α -спиралей и 8 петель кристаллического фрагмента белка данных о распределении метки по триптических пептидам этого отрезка белка получается картина, представленная на рис. 4.28 (левая часть рисунка).

К сожалению, распределение метки между остатками аминокислот в самих пептидах пока не определено, что существенно затрудняет построение детализованной трехмерной модели структуры.

Предсказание топологии С-концевого домена M1 белка, для которого нет данных РСА, представляло собой отдельную задачу. В отличие от глобулярных белков, для которых методы предсказания элементов вторичной структуры базируются на данных РСА более чем 100 белков, для мембранных белков нет надежных методов предсказания даже трансмембранных элементов. Однако, если предположить, что, как и в доменах М и N, спирали формируются кластерами аминокислот, образующими протяженные гидрофобные области, то в "развертке" последовательности 159–252, представленной как единая α -спираль, можно выделить 4 протяженные гидрофобные области в участках последовательности белка: 165–173, 179–193, 199–219 и 223–251. Используя далее принцип "ломки" этой спирали по гидрофобным участкам [60], можно выделить 4 α -спирали, обозначенные по аналогии с работой [74] как H10–H13 и соответственно 4 петле-

образные области L9–L12. Четыре α -спиральных участка предсказываются в С-концевом домене и по алгоритму, предложенному Финкельштейном для полностью интегрированных в мембрану белков [70]. В целом положение спиралей в последовательности совпадает с предсказанным путем "ломки" гипотетической спирали, однако положение N- и С-концевых остатков и протяженности спиралей несколько отличаются. Наиболее существенны различия в положениях N-концевых остатков и протяженностях спиралей H10 (5 остатков вместо 11) и H13 (8 остатков вместо 28). Заметим, что алгоритм Финкельштейна в целом неплохо (по сравнению с другими теоретическими подходами) описывает вторичную структуру N- и М-доменов, определенную по данным рентгеноструктурного анализа для воднорастворимого фрагмента. Из девяти α -спиралей хорошо предсказываются семь, не предсказывается короткая спираль H5 и спираль H7. Кроме того, спирали H8 и H9 по этому алгоритму предсказываются как одна длинная спираль, N-конец которой совпадает с началом спирали H8, а С-конец на три остатка (один виток) ближе по последовательности, чем соответствующий концевой остаток в спирали H9. Так или иначе, но С-концевой домен белка, структуру которого пока не удалось определить рентгеноструктурным анализом, по всей видимости, представляет собой пучок из четырех α -спиралей, соединенных с М-доменом петлей L9 из 6–12 остатков. На рис. 4.28 (правая часть) приведена топология четырехспирального С-концевого домена с обозначением доступных для трития областей, построенная по результатам предсказания вторичной структуры по Финкельштейну.

Для корректного построения модели пространственной структуры белка M1 в составе мембраны необходима детализация профиля доступности до уровня отдельных аминокислотных остатков, однако и "пептидный уровень" позволяет сделать вполне определенные выводы об общей архитектуре макромолекулы и ориентации ее элементов относительно поверхности вириона.

На рис. 4.28 видно, что единственно возможный способ укладки спиралей в пространстве с тем, чтобы доступные для включения метки фрагменты белка были ориентированы к поверхности вириона, а недоступные были бы или глубже их, или лежали бы под ними – это расположение α -спиралей во внутреннем слое бислойной мембраны или ниже, но под разными углами, как это схематично представлено на рис. 4.29.

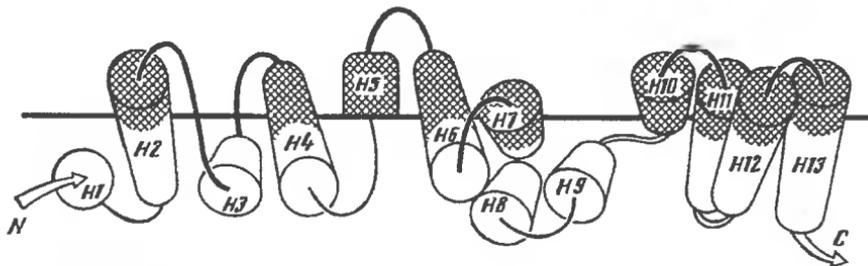


Рис. 4.29. Схема укладки М1 белка в мембране вируса гриппа А

Для простоты изображения цилиндры, имитирующие α -спирали, специально разнесены

Так, спираль H1 и петля L1 (пептид T1), не являясь мечеными, будут располагаться в нижнем слое, а С-конец спирали H2 и часть петли L2 должны быть ориентированы к поверхности вириона, чтобы быть доступными для потока атомов трития, т.е. мечеными, как и петля ДЗ и конец спирали H4 и т.д. Такое, под разными углами, расположение α -спиралей в модели мембранного М1 белка, вытекающее из экспериментальных данных по включению метки в белок в составе вируса, хорошо согласуется с результатами анализа данных РСА для трех мембранных белков по упаковке их спиралей, сделанного в работе [31]. Трансмембранные спирали в них наклонены к нормали мембраны в среднем под углом 21° . Дальнейшая детализация картины распределения метки в М1 белке до уровня оценки удельной радиоактивности отдельных аминокислот, безусловно, позволит получить более точное представление о его пространственной укладке в вирусе.

В заключение следует сказать, что предложенная модель укладки М1 белка в составе вируса, полученная на основании экспериментальных данных тритиевого мечения интактных вирусных частиц, использования данных РСА о топологии фрагмента М1 белка и предсказания топологии С-концевого фрагмента, отличается от модели, предложенной в работе [74]. Это не удивительно, так как нет никаких оснований ожидать, что в кристалле, где белок находится в водном окружении, и в нативном вирусе, где белок находится в липидном бислое, структура белка идентична. Более того, данные РСА для водорастворимого фрагмента М1 белка не позволяют предложить модель укладки белка в вирионе. Авторы полагают, что для связывания структуры закристаллизованного фрагмента М1 белка (остатки 2–158) с

мембраной должно иметь место крупномасштабное изменение расположения ряда спиралей друг относительно друга с тем, чтобы экспонировать к мембране гидрофобную поверхность N-домена, образующую контакт N- и M-доменов и "спрятанную" в кристаллической структуре при рН 4.0. Расположение С-домена в области контакта с NA-белком и молекулой РНК полностью гипотетично и не согласуется с экспериментальными данными о доступности составляющих его пептидов.

Модель М1 белка, полученная на основании данных метода тритиевой планиграфии, по всей видимости, более адекватно отражает реальную структуру этого белка в составе вириона.

4.6. Тритиевая планиграфия как экспериментальный метод исследования поверхности целых клеток

Знание топографии поверхности мембранных структур имеет принципиальное значение для понимания широкого круга вопросов современной молекулярной биологии клетки. Между тем, имеющиеся экспериментальные методы далеко не всегда позволяют получить данные с необходимой степенью детализации и, как правило, заставляют ограничиться полуколичественными выводами об экспонированности отдельных белковых компонентов, о составе липидного бислоя и т.п.

Так, например, определить ход полипептидной цепи в мембране с точностью до нескольких остатков аминокислот удалось лишь в отдельных и весьма немногочисленных случаях [72]. В качестве примера можно привести работу по изучению топографии бактериородопсина в мембране. Пурпурные мембраны после ограниченного протеолиза с помощью папаина или расщепления боргидридом натрия подвергали тритиевой "бомбардировке" и в выделенных крупных пептидах определяли содержание трития в аминокислотном остатке на каждом шаге после автоматической деградации по Эдману. Проведение указанных исследований на образцах бактериородопсина, селективно меченных ^{14}C , позволило проконтролировать ход деградации и количественно определить включение метки в определенные аминокислотные остатки. Метод тритиевой планиграфии дал возможность различить аминокислотные остатки, лежащие внутри мембраны, и участки полипептидной цепи, находящиеся вблизи или на поверхности мембраны (рис. 4.30). На основании полученных результатов

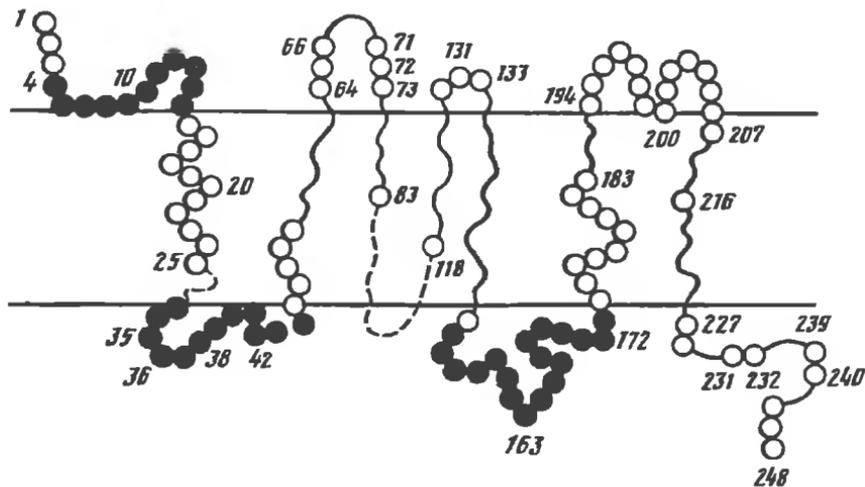


Рис. 4.30. Схема укладки полипептидной цепи бактериородопсина в мембране

Затемненными кружками показаны остатки аминокислот, в которых обнаружено включение метки. Участки 25–33, 66–71, 83–118, 207–231, 232–239, 240–246 не анализировались

предложена схема укладки ряда участков полипептидной цепи бактериородопсина в мембране [86], однако перенесение этих результатов, полученных на лиофильно высушенных мембранах, на живую клетку без дополнительных контрольных экспериментов едва ли правомерно.

При изучении возможности приложения метода тритиевой планиграфии к исследованию поверхности целой клетки принципиальным был вопрос о сохранении целостности клеточной мембраны в условиях, используемых при введении метки, и о том, в какой мере плазматическая мембрана является препятствием для проникновения атомов трития во внутренние области клетки. Эти соображения определили выбор в качестве тест-системы исследования наиболее изученного типа клеток – эритроцитов человека [6]. Эритроциты исследовались в виде водных суспензий. Из опробованных буферных систем наиболее пригодным, с точки зрения сохранности эритроцитов, оказался буферный раствор, содержащий ~15% глицерина. В качестве контроля использовали раствор гемоглобина в воде.

Сопоставление данных удельной радиоактивности индивидуальных аминокислот гемоглобина, меченного тритием в свободном состоянии, с результатами, полученными для гемогло-

бина, помеченного в составе эритроцита, показало, что значения включенной метки различаются более чем на два порядка. Практически включение трития в гемоглобин внутри эритроцита приближалось к уровню фона сцинтиллятора. При этом была обнаружена высокая удельная активность мембраны эритроцита. Если использовать определенный в экспериментах с липосомами коэффициент ослабления потока трития в фосфолипидном слое, $k = 0.046 \text{ \AA}^{-1}$, то для толщины мембраны клетки эритроцита получим величину $\sim 100 \text{ \AA}$ ($I/I_0 = e^{-0.046x} = 0.01 = e^{-4.60}; x \approx 100$), что неплохо согласуется с известными данными. Действительно, мембрана эритроцитов по составу и плотности, наличию как поверхностных, так и внутримембранных белков, существенно отличается от искусственной бислоистой мембраны липосомы. Она более плотная и много толще.

Таким образом, на примере клетки крови – эритроцитов – было показано, что при соблюдении определенных условий целостность клеток сохраняется и плазматическая мембрана является экраном, препятствующим проникновению атомов трития во внутренние сферы клеток, т.е. метод тритиевой планиграфии может быть применен к исследованию клеточной поверхности.

В качестве примера удачного использования метода тритиевой планиграфии можно привести также работу по тритированию мембран интактных клеток бактерий [15]. Среди проблем бактериальной мембранологии две проблемы представляются наиболее актуальными в связи с интенсивными попытками использовать бактерии при решении биотехнологических, медицинских и других задач. Во-первых, этот вопрос о выходе компонентов мембраны (потенциальных антигенов) на поверхность клеточной оболочки и о непосредственном участии мембраны в межклеточных взаимодействиях прокариот. Во-вторых, это вопрос о возможности прижизненной модификации мембран бактерий с целью направленного изменения их метаболизма. В решении этих проблем метод тритиевой планиграфии открывает новые и интересные возможности.

При облучении интактных клеток и протопластов бактерий *Micrococcus luteus* было установлено, что более 90% необмениваемого (стабильная метка) трития включается в цитоплазматическую мембрану, что говорит о том что она достаточно плотна и "хорошо" защищает внутреннее содержимое бактерии.

Показано также, что в случае протопластов тритий включается преимущественно в три мембранных белка, возможно, экспонированных на внешней стороне мембраны. В случае клеток – в один белок с молекулярной массой 14 кДа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абдурашидова Г.Г., Пивазян А.Д., Турчинский М.Ф., Будовский Э.И. // Биоорган. химия. 1980. Т. 6. С. 626–628.
2. Бобкова А.Ф., Гольдштейн М.И., Кафтанова А.С., Добров Е.Н., Атабеков И.Г. // Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология. 1989. Вып. 2. С. 35–41.
3. Волынская А.В., Скрипкин А.Ю., Шишков А.В., Гольданский В.И. // Докл. АН СССР. 1982. Т. 266. С. 871–874.
4. Гедрович А.В., Юсупов М.М., Шишков А.В., Гольданский В.И. Спиринов А.С. // Там же. Т. 267. С. 1255–1527.
5. Гольдштейн М.И., Гребенищikov Н.И., Куст С.В., Кафтанова А.С., Добров Е.Н., Атабеков И.Г. // Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология. 1990. Вып. 2. С. 9–16.
6. Гордеева Л.В., Баратова Л.А., Марголис Л.Б., Шишков А.В. // Биофизика. 1989. Т. 36. С. 971–975.
7. Жирнов О.П., Охучи М., Авякянц В.С., Овчаренко А.В., Кленк Х.Д. // Молекуляр. биология. 1997. Т. 31. С. 137–143.
8. Каширин И.А., Гедрович А.В., Шишков А.В., Каграманова В.К., Баратова Л.А. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. С. 1531–1534.
9. Ксенофонтов А.Л., Жирнов О.П., Данилов А.В., Баратова Л.А. // Молекуляр. биология. 1995. Т. 29. С. 635–643.
10. Ксенофонтов А.Л., Бадун Г.А., Кордюкова Л.В. // Там же. 1998. Т. 32. С. 379.
11. Колб В.А., Коммер А.А., Спиринов А.С. // Докл. АН СССР. 1987. Т. 296. С. 1497–1501.
12. Колб В.А., Спиринов А.С. // Успехи биол. химии. 1993. Т. 33. С. 3–12.
13. Морозов С.Ю., Захарьев В.И., Чернов В.К., Просолов В.С., Козлов Ю.В., Атабеков И.Г., Скрыбин К.Г. // Докл. АН СССР. 1983. Т. 271. С. 211–215.
14. Нейман Л.А., Антропова Л.П., Залеская М.А., Будовский Э.И. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. С. 1070–1072.
15. Островский Д.Н., Капрельянц А.С., Лукьянова М.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 1983. Т. 19. С. 60–65.
16. Радавский Ю.Л., Заикин А.А., Витер С.С., Турова И.П., Грама Д.П., Бобкова А.Ф., Гольдштейн М.И., Яркевольд Л.В., Сыбер Ю.П., Саарма М.Ю. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. С. 20–26.
17. Спиринов А.С., Агафонов Д.Е., Колб В.А., Коммер А. // Биохимия. 1996. Т. 61. С. 1928–1930.
18. Agafonov D.E., Kolb V.A., Spirin A.S. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1997. Vol. 94. P. 12892–12897.

19. Altschuh C., Lesk A.M., Bloomer A.S., Klug A. // *J. Mol. Biol.* 1987. Vol. 193. P. 693–707.
20. Arakawa H., Umemura K., Ikai A. // *Nature.* 1992. Vol. 358. P. 171–173.
21. Ban N., Freeborn B., Nissen P., Penczek P., Grassucci R.A., Sweet R., Frank J., Moore P.B., Steitz T.A. // *Cell.* 1998. Vol. 93. P. 1105–1115.
22. Baunert H.G., Skoeld S.E., Kurland C.G. // *Europ. J. Biochem.* 1978. Vol. 89. P. 353–359.
23. Belayev N.D., Budker V.G., Dubrovskaya V.A., Kim A.A., Kiseleva E.V., Sidorov V.N. // *Amer. J. Human Genet.* 1990. Vol. 47. P. 746–749.
24. Belayev N.D., Budker V.G., Dubrovskaya V.A., Kim A.A., Kiseleva E.V., Sidorov V.N. // *FEBS Lett.* 1992. Vol. 297. P. 43–45.
25. Bernabeu C., Lake J.A. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1982. Vol. 79. P. 3111–3115.
26. Bhyravbhatla B., Wotowich S.J., Caspar L.D. // *Biophys. J.* 1998. Vol. 74. P. 604–615.
27. Bizebard T., Gigant B., Rigolet P., Rasmussen B., Diat O., Bosecke P., Wharton S., Skehel J.J., Knossow M. // *Nature.* 1995. Vol. 376. P. 92–94.
28. Blobel G., Sabatini D.D. // *J. Cell Biol.* 1970. Vol. 45. P. 130–145.
29. Bloomer A.C., Butler P.J.G. // *The plant viruses* / Ed. M.H.V. van Regenmortel and H. Fraenkel-Conrat. N.Y.: Plenum, press, 1986. Vol. 2. P. 19–57.
30. Bloomer A.C., Champness J.N., Bricogne G., Staden R., Klug A. // *Nature.* 1978. Vol. 276. P. 362–368.
31. Bowie J. // *J. Mol. Biol.* 1998. Vol. 272. P. 780–789.
32. Brimacombe R., Maty P., Zwieb C. // *Progr. Nucl. Acids Res. and Mol. Biol.* 1983. Vol. 28. P. 1–48.
33. Bucher D., Pople S., Baer M., Mikhail A., Gong Y.-F., Whitaker C., Paoletti E., Judd A. // *J. Virol.* 1989. Vol. 63. P. 3622–3633.
34. Bullough P.A., Hughson F.M., Skehel J.J., Wiley D.C. // *Nature.* 1994. Vol. 371. P. 37–43.
35. Capel M.S., Engelman D.M., Freeborn B.R., Kjeldgaard M., Langer J.A., Ramakrishnan V., Schindler D.G., Schneider D.K., Shoenborn B.P., Sillers I.Y., Yabuki S., Moore P.B. // *Science.* 1987. Vol. 238. P. 1403–1406.
36. Caspar D.L.D. // *Adv. Protein Chem.* 1963. Vol. 18. P. 37–121.
37. Chiam C.L., Wagner R. // *Biochemistry.* 1983. Vol. 22. P. 1193–1200.
38. Cover J.A., Lambert J.M., Norman C.M., Traut R.R. // *Ibid.* 1981. Vol. 20. P. 2843–2852.
39. Egorov T.A., Svenson A., Ryden L., Carlson J. // *Proc Nat. Acad. Sci. USA.* 1975. Vol. 72. P. 3029–3033.
40. Fedorova N.V., Ksenofontov A.L., Viryasov M.B., Baratova L.A., Timofeeva T.A., Zhirnov O.P. // *J. Chromatogr. B.* 1998. Vol. 706. P. 83–89.
41. Flavell R. // *Annu. Rev. Plant Physiol.* 1980. Vol. 31. P. 569–580.
42. Fujiyoshi Y., Kume N.P., Sakata K., Sato S. // *EMBO J.* 1994. Vol. 13. P. 318–326.
43. Glushakova S.E., Ksenofontov A.L., Fedorova N.V., Mazul L.A., Ageeva O.N., Margolis L.B., Baratova L.A., Shishkov A.V. // *Biosci. Rep.* 1991. Vol. 11. P. 131–137.
44. Gregoriades A. // *J. Virol.* 1980. Vol. 36. P. 470–479.
45. Gregoriades A., Frangione B. // *Ibid.* 1981. Vol. 40. P. 323–328.

46. *Hankins R.W., Nagata K., Kato A., Ishihama A. // Res. Virol. 1990. Vol. 141. P. 305–314.*
47. *Henderson R., Baldwin J.M., Ceska T.M., Zemlin F., Beckmann E., Downing K.H. // J. Mol. Biol. 1990. Vol. 213. P. 899–929.*
48. *Hestekamp T., Hauser S., Lütke H., Bukau B. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1996. Vol. 93. P. 4437–4441.*
49. *Hoekstra D., Kok J.W. // Biosci. Rep. 1989. Vol. 9. P. 273–305.*
50. *Joassin L., Vincenzotto C., Cloes J.-M., Bouchet M., Reginster M. // Arch. Virol. 1987. Vol. 95. P. 181–195.*
51. *Kahan L., Winkelman D.A., Lake J.A. // J. Mol. Biol. 1981. Vol. 145. P. 193–214.*
52. *Koenig R., Torrance L. // J. Gen. Virol. 1986. Vol. 67. P. 57–67.*
53. *Koenig R., Skagemann H., Francksen M. // Biochim. et biophys. acta. 1970. Vol. 207. P. 184–190.*
54. *Koenig R., Tremaine J.H., Shepard J.F. // J. Gen. Virol. 1978. Vol. 38. P. 329–337.*
55. *Laemmli U.K. // Nature. 1970. Vol. 227. P. 680–685.*
56. *Lak J.A., Strycharz W.A. // J. Mol. Biol. 1981. Vol. 153. P. 979–992.*
57. *Lambert J.M., Boileau G., Cover J.-A., Traut R.R. // Biochemistry. 1983. Vol. 22. P. 3913–3920.*
58. *Lambert J.M., Traut R.R. // J. Mol. Biol. 1981. Vol. 149. P. 451–476.*
59. *Lanzrein M., Schlegel A., Kempf C. // Biochem. J. 1994. Vol. P. 302–320.*
60. *Lim V.I. // J. Mol. Biol. 1974. Vol. 88. P. 273–294.*
61. *Liu J., Lynch P.A., Chen-ya-Chien, Montelione G.T., Krug R.M., Bertram H.M. // Nature. Struct. Biol. 1997. Vol. 4. P. 896–899.*
62. *Malkin L.J., Rich A. // J. Mol. Biol. 1967. Vol. 26. P. 329–346.*
63. *Maly P., Wawer J., Zohava M., Brimacombe R. // Biochemistry. 1983. Vol. 22. P. 3157–3162.*
64. *Martin K., Helenius A. // Cell. 1991. Vol. 67. P. 117–130.*
65. *McLachlan A.D., Bloomer A.C., Buttler P.J.G. // J. Mol. Biol. 1980. Vol. 136. P. 203–224.*
66. *Moore P.B., Capel M., Kjeldgaard M., Engelman D.M. // Structure, function and Genetics of ribosomes / Ed. B. Hardesty, G. Kramer. N.Y.: Springer, 1986. P. 89–73.*
67. *Namba K., Stubbs G. // Science. 1986. Vol. 231. P. 1401–1406.*
68. *Namba K., Pattanayek R., Stubbs G. // J. Mol. Biol. 1989. Vol. 208. P. 307–325.*
69. *Nikonov S., Nevskaya N., Eliseikina I., Fomenkova N., Nikulin A., Ossina N., Garber M., Jonsson B.-H., Briand C., Al-Karadaghi S., Svensson A., Liljas A. // EMBO J. 1996. Vol. 15. P. 1350–1359.*
70. *Ptitsyn O.B., Finkelstein A.V. // Biopolymers. 1983. Vol. 22. P. 15–25.*
71. *Rich A.E. // Potato diseases. N.Y.; L.: Acad. press, 1983.*
72. *Rost B., Fariselli P., Casadio R. // Protein Sci. 1996. Vol. 5. P. 1704–1718.*
73. *Sawyer L., Tollin P., Wilson H.R. // J. Gen. Virol. 1987. Vol. 68. P. 1229–1232.*
74. *Sha B., Luo M. // Nature. Struct. Biol. 1997. Vol. 4. P. 239–244.*
75. *Shukla D.D., Strike P.M., Tracy S.L., Gough K.H., Ward C.W. // J. Gen Virol. 1988. Vol. 69. P. 1497–1508.*

76. Smith W.P., Tai P.-C., Davis B.D. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1978. Vol. 75. P. 5922–5925.
77. Sober J., Jarvekul L., Toots I.E., Radavsky Yu.L., Litemis R., Saarma M.J. // J. Gen. Virol. 1988. Vol. 69. P. 1799–1807.
78. Stegman T., Helenius A. // Viral fusion mechanisms / Ed. J. Bentz. Boca Raton (Fla): CRC press, 1993. P. 89–111.
79. Stegman T., Delfino J.M., Richards F.M., Helenius A. // J. Biol. Chem. 1991. Vol. 266. P. 18404–18410.
80. Stinchcomb D.T., Struht K., Davis R.W. // Nature. 1979. Vol. 282. P. 39–41.
81. Stoller G., Rücknagel K.P., Nierhaus K., Schmid F.X., Fischer G., Rahfeld J.-U. // EMBO J. 1995. Vol. 14. P. 4939–4948.
82. Stoeffler G., Stoeffler-Meilicke M. // Annu. Rev. Biophys. and Bioeng. 1984. Vol. 13. P. 303–330.
83. Stoeffler G., Stoeffler-Meilicke M. // Structure, function and genetics of Ribosomes / Ed. B. Hardesty, G. Kramer. N.Y.: Springer, 1986. P. 28–37.
84. Stubbs G., Warren S., Holmes K. // Nature. 1977. Vol. 267. P. 216–221.
85. Stubbs G. // Semin. Virol. 1990. Vol. 1. P. 405–412.
86. Tsetlin V.I., Alyonycheva T.N., Shemyakin V.V., Neiman L.A., Ivanov V.T. // Europ. J. Biochem. 1988. Vol. 178. P. 123–129.
87. Tsusita A., Gish D.T., Young J., Fraenkel-Conrat H., Knight C., Stanley W.M. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1960. Vol. 46. P. 1463–146.
88. Torrance L., Larkins A.P., Butcher G.W. // J. Gen. Virol. 1986. Vol. 67. P. 57–67.
89. Valent Q.A., Kendall D.A., High S., Kusters R., Oudega B., Luirink J. // EMBO J. 1995. Vol. 14. P. 5494–5505.
90. Varghese J.N., Laver W.G., Colman P.M. // Nature. 1983. Vol. 303. P. 41–44.
91. Wang S., Sakai H., Wiedmann M. // J. Cell Biol. 1995. Vol. 130. P. 519–528.
92. Wang D.N., Kuhlbrandt W. // J. Mol. Biol. 1991. Vol. 217. P. 691–699.
93. Watanabe K., Handa H., Mizumoto K., Nagata K. // J. Virol. 1996. Vol. 70. P. 241–247.
94. Watowich S.J., Skehel J.J., Wiley D.C. // Structure. 1994. Vol. 2. P. 719–731.
95. White J.M. // Cellular receptors for animal viruses / Ed. E. Wimmer. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. press, 1994. P. 281–301.
96. White J., Kielian M., Helenius A. // Quart. Rev. Biophys. 1983. Vol. 16. P. 151–195.
97. Wiley D.C., Skehel J.J. // Annu. Rev. Biochem. 1987. Vol. 56. P. 365–373.
98. Wilson I., Skehel J.J., Wiley D.C. // Nature. 1981. Vol. 289. P. 366–373.
99. Wilzbach K.E. // J. Amer. Chem. Soc. 1957. Vol. 79. P. 1013–1016.
100. Winter G., Fields S. // NAR. 1980. Vol. 8. P. 1965–1974.
101. Ye Z., Baylor N.W., Wagner R.R. // J. Virol. 1989. Vol. 63. P. 3586–3594.
102. Ye Z., Robinson D., Wagner R.R. // Ibid. 1995. Vol. 69. P. 1964–1970.
103. Yusupov M.M., Spirin A.S. // Meth. Enzymol. 1988. Vol. 164. P. 426–439.
104. Yusupov M.M., Spirin A.S. // FEBS Lett. 1986. Vol. 197. P. 229–233.
105. Zhirnov O.P. // Virology. 1992. Vol. 186. P. 324–330.